

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Michal Tupec

Antioxidační vlastnosti léčivých rostlin  
Antioxidant properties of medicinal plants

Bakalářská práce

Vedoucí práce: RNDr. Veronika Hýšková, Ph.D. (roz. Doubnerová)

Konzultant: doc. RNDr. Helena Ryšlavá, CSc.

Praha 2013

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

.....

Michal Tupec

**Poděkování:**

Zde bych rád poděkoval svojí školitelce paní RNDr. Veronice Hýskové, Ph.D., a vedoucí laboratoře paní doc. RNDr. Heleně Ryšlavé, CSc., za jejich odborné rady a ochotu kdykoli pomoci.

Dále bych velmi rád poděkoval své rodině za všestrannou podporu během studia i mimo něj.

V neposlední řadě děkuji i všem kolegům z laboratoře 209 za vytvoření přátelského pracovního prostředí.

Tato práce vznikla mimo jiné v rámci projektu UNCE 204025/2012 financovaného Univerzitou Karlovou v Praze.

## Abstrakt

U rostlin se během evoluce vyvinuly velmi účinné mechanizmy likvidace škodlivých sloučenin, mezi něž se řadí např. reaktivní formy kyslíku (ROS). Tyto mechanizmy jsou založeny převážně na antioxidačních účincích kyseliny askorbové a glutathionu v úzké kooperaci se superoxiddismutasou, katalasou a rozličnými peroxidasami – velkou roli při eliminaci ROS rovněž hrají redukované koenzymy NADH a NADPH.

V poslední době se však pozornost obrací od těchto klíčových sloučenin primárního metabolismu k sekundárním metabolitům. Fenolické sloučeniny společně s některými terpeny a alkaloidy podle všeho také vykazují antioxidační účinky a zřejmě hrají v životě rostliny nezastupitelnou úlohu – kromě antioxidačního působení jsou důležité také v boji proti patogenům a býložravcům, při lákání opylovačů nebo zmírňování účinků UV záření. Přírodní látky jsou zkoumány také ve vztahu k člověku – je známa celá řada účinků a mezi ty nejčastější patří antioxidační, protizánětlivé a protirakovinné.

V rámci této práce byly získány extrakty převážně nízkomolekulárních látek ze 32 rostlin pomocí horké vody, 80%w vodného roztoku methanolu či prostým odšťavněním. Extrakty byly podrobeny třem standardním testům antioxidační aktivity: dvěma stanovením antioxidační kapacity vztažené na ekvivalenty troloxu (TEAC) a stanovení redukční síly (FRAP). Zároveň byly stanoveny celkové fenolické látky a flavonoidy.

Čajovník (*Camellia sinensis*), řepík (*Agrimonia eupatoria*), dobromysl (*Origanum vulgare*) a máta (*Mentha x piperita*) vykázaly nejvyšší hodnoty antioxidační aktivity a obsahu fenolických látek. Nejvyšší obsah flavonoidů byl zjištěn u dobromysli, máty a šalvěje (*Salvia officinalis*). U zeleniny byly nalezené hodnoty řádově nižší.

Rovněž byly prokázány velmi dobré korelace ( $R \geq 0,9$ ) mezi obsahem fenolických látek u rostlin a jejich antioxidační aktivitou a mezi různými metodami zjištěnými antioxidačními aktivitami navzájem.

**Klíčová slova:** radikály, léčivé rostliny, přírodní látky, antioxidanty, extrakce

## Abstract

During the evolution plants have developed rather efficient mechanisms for the removal of harmful compounds, which include e. g. the reactive oxygen species (ROS). These mechanisms are mainly based on the antioxidant effects of ascorbic acid, glutathione in intimate cooperation with superoxide dismutase, catalase and various peroxidases – the reduced coenzymes, NADH and NADPH, play a major role in the ROS elimination, too.

However, in recent times, the attention has turned from these key compounds of primary metabolism to secondary metabolites. Interestingly, the phenolic compounds together with some terpenes and alkaloids exhibit antioxidant effects, too, and apparently they play an irreplaceable role in the life of a plant – besides their antioxidant action they are also important in the fight against pathogens and herbivores, in attracting the pollinators or in the moderation of UV light effects. Natural products are also studied in their relation to man – a broad variety of effects is known including the antioxidant, anti-inflammatory and anticancer effects for the most part.

In this work, extracts comprising mainly of low-molecular-weight compounds were obtained from 32 plants with either hot water, 80 %w aqueous methanol or just by plain juicing. The extracts were then examined by three standard antioxidant activity assays: two Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) assays and the Ferric Ion Reducing Antioxidant Power (FRAP) assay. The total phenolic content (TPC) along with the flavonoid content were also determined.

The tea plant (*Camellia sinensis*), agrimony (*Agrimonia eupatoria*), oregano (*Origanum vulgare*) and mint (*Mentha x piperita*) showed the highest values for antioxidant activity and total phenolics content. The highest content of flavonoids was found in oregano, mint and sage (*Salvia officinalis*). In vegetables the values found were an order of magnitude lower.

In addition, very good correlations ( $R \geq 0,9$ ) were proved to be between the total phenolics content in plants and their antioxidant activities and between the variously determined antioxidant activities itself.

(In Czech)

**Keywords:** radicals, medicinal plants, natural products, antioxidants, extraction

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b>	<b>8</b>
1.1	Látky s oxidujícími vlastnostmi . . . . .	8
1.1.1	Reaktivní formy kyslíku . . . . .	9
1.1.2	Poškození biologických molekul . . . . .	11
1.2	Antioxidační látky . . . . .	14
1.2.1	Kyselina askorbová, glutathion a antioxidační enzymy . . . . .	14
1.2.2	Tokochromanoly a karotenoidy . . . . .	18
1.2.3	Sekundární metabolity . . . . .	20
1.2.3.1	Fenolické látky . . . . .	22
1.3	Metody stanovení antioxidačních vlastností . . . . .	25
1.3.1	Metody založené na přenosu elektronu či atomu vodíku . . . . .	25
1.3.2	Metody založené na komplexnějších reakcích . . . . .	28
<b>2</b>	<b>Cíl práce</b>	<b>30</b>
<b>3</b>	<b>Materiál a metody</b>	<b>31</b>
3.1	Chemikálie a roztoky . . . . .	31
3.1.1	Rozpouštědla . . . . .	31
3.1.2	Čisté látky . . . . .	31
3.1.3	Činidla a ostatní . . . . .	31
3.2	Přístrojové vybavení . . . . .	32
3.3	Rostlinný materiál . . . . .	32
3.4	Experimentální metody . . . . .	34
3.4.1	Extrakce rozpouštědlem . . . . .	34
3.4.2	Extrakce šťáv . . . . .	34
3.4.3	Stanovení ztráty sušením rostlinného materiálu . . . . .	35
3.4.4	Stanovení zbytku po vysušení extraktu . . . . .	35
3.4.5	Stanovení obsahu fenolických látek . . . . .	36
3.4.6	Stanovení obsahu flavonoidů . . . . .	36
3.4.7	Stanovení antioxidačních vlastností metodou DPPH . . . . .	37
3.4.8	Stanovení antioxidačních vlastností metodou ABTS . . . . .	38
3.4.9	Stanovení antioxidačních vlastností metodou FRAP . . . . .	40
3.4.10	Výpočet molárního zastoupení . . . . .	40
3.5	Statistické vyhodnocení a regresní analýza . . . . .	41
<b>4</b>	<b>Výsledky</b>	<b>43</b>
4.1	Výsledky gravimetrických stanovení . . . . .	43
4.2	Výsledky skupinových stanovení . . . . .	46
4.3	Výsledky stanovení antioxidačních vlastností . . . . .	50
4.4	Korelační analýza . . . . .	55
<b>5</b>	<b>Diskuze</b>	<b>58</b>
<b>6</b>	<b>Shrnutí</b>	<b>62</b>
	<b>Reference</b>	<b>63</b>

## Seznam použitých zkratk a značek

Následující seznam zkratk a značek použitých v této práci zahrnuje i výrazy od udaných odvozené, tedy např. zkratka DPPH znamená primárně *N,N*-di(fenyl)-pikrylhydrazyl, ale vztahuje se také na od něj odvozené tvary.

%v	objemové procento
%w	hmotnostní procento
ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonát)
DPPH	<i>N,N</i> -di(fenyl)pikrylhydrazyl
EA	ekvivalent askorbátu
EC	číslo enzymové klasifikace (z angl. <i>Enzyme Commission number</i> )
EF	ekvivalent fenolu
EK	ekvivalent kvercetinu
ET	ekvivalent troloxu
FL	flavonoid
FRAP	redukční (antioxidační) síla (z angl. <i>ferric ion reducing antioxidant power</i> )
HAT	přenos atomu vodíku (z angl. <i>hydrogen atom transfer</i> )
PL	fenolická látka
ROS	reaktivní formy kyslíku (z angl. <i>reactive oxygen species</i> )
SET	přenos jednoho elektronu (z angl. <i>single electron transfer</i> )
TEAC	antioxidační kapacita vyjádřená v ekvivalentech troloxu (z angl. <i>trolox equivalent antioxidant capacity</i> )
TPTZ	2,4,6-tripyridyl- <i>s</i> -triazin

# 1 Úvod

Narozdíl od většiny vyšších organizmů žijí rostliny celý život přisedle bez možnosti úniku před nebezpečím. Během evoluce se u nich proto musely vyvinout účinné mechanismy [1], které by tuto jejich zdánlivou nevýhodu eliminovaly či alespoň snížily její dopad. Rostliny jsou právě z tohoto důvodu velmi dobrým zdrojem celé škály antioxidantních látek.

V dnešní době se leckdy některé syntetické antioxidanty vyskytují na seznámech látek podezřelých z karcinogenity či mutagenity [2]; je proto žádoucí hledat nové zdroje přirozených antioxidantů (zde však samozřejmě neplatí, že přírodní antioxidanty nemohou být karcinogenní).

Přívlastek „antioxidační“ značí schopnost určité chemické látky nebo směsi látek redukovat ty oxidanty, jež bývají pro daný organismus škodlivé (vizte dále), – jinými slovy se tedy jedná o redukční schopnost vztaženou na biologický systém.

## 1.1 Látky s oxidujícími vlastnostmi

Oxidanty či látky s oxidačními / oxidujícími vlastnostmi mohou být obecně definovány jako látky, jež z termodynamického hlediska pro dosažení stability musí za daných podmínek přijmout určitý počet elektronů, tj. redukovat se. Je nutné podotknout, že označení antioxidant / reduktant versus oxidant je pouze relativní, vztaženo pro konkrétní reakční partnery a podmínky.

K nejprozkoumanějším přirozeným oxidantům patří bezpochyby reaktivní formy kyslíku (ROS, *reactive oxygen species*), tedy kyslíkaté sloučeniny vzniklé „aktivací“ (energetickou excitací či neúplnou redukcí) kyslíku molekulárního [3, 4]. ROS jsou z velké části zodpovědny za oxidativní poškození důležitých buněčných součástí, především nukleových kyselin, proteinů a lipidů, ale i polysacharidů, v rámci procesů oxidativního stresu [1, 5], jehož vliv je spojován s procesy buněčné smrti, se stárnutím organismu a rakovinou. Oxidativní stres je u rostlin často důsledkem jiných druhů stresu abiotického (sucho, chlad, horko, soli, UV záření) nebo biotického (patogeny, škůdci) [3].

ROS se dají formálně rozdělit na neradikálové, kam patří singletový kyslík a peroxidy, a radikálové, mezi něž se řadí superoxid, hydroperoxyl a peroxyly [5].

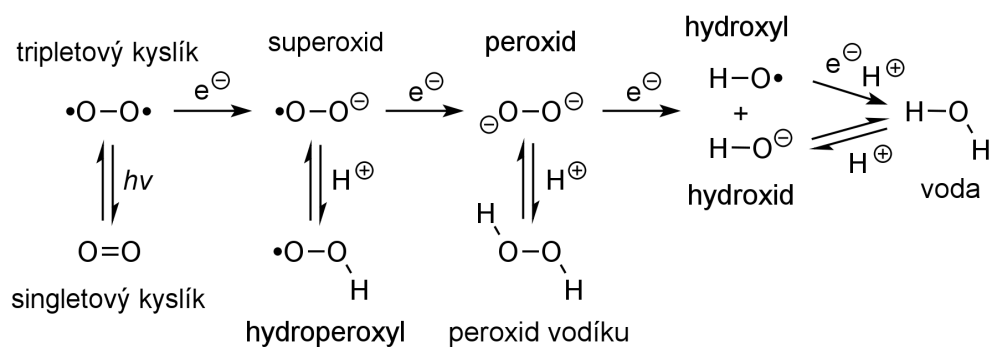
Kromě reaktivních forem kyslíku se obecně k reaktivním sloučeninám řadí ještě ozon ( $O_3$ ), reaktivní formy dusíku (RNS, *reactive nitrogen species*) [6], např. oxid dusnatý ( $NO^\bullet$ ), peroxydusitany (peroxynitrity,  $ONOO^-$ ), dusitany ( $NO_2^-$ ), nitrosylový kation ( $NO^+$ ), a také sekundárně vzniklé radikály lipidylové ( $L^\bullet$ ), thiylové ( $RS^\bullet$ ), pro-



teinylové ( $P^\bullet$ ).

### 1.1.1 Reaktivní formy kyslíku

Molekulární kyslík neboli dikyslík ( $O_2$ ) se vyskytuje v zemské atmosféře v koncentraci 21 %v [7], to znamená, že organismy žijící v běžném prostředí se styku s kyslíkem nemohou vyhnout. Většina vyšších organismů včetně rostlin a člověka kyslík dokonce přímo využívá jako terminální akceptor elektronů získaných při oxidaci látek získaných z potravy v energeticky výhodném procesu zvaném aerobní respirace [8], a tudíž je pro jejich přežití esenciální, – za tuto možnost organismy platí daň v podobě neustálého boje s jeho částečně redukovanými formami [3, 8, 9], jež musí být pro zdárné přežití udržovány na přísně hlídaných hladinách.



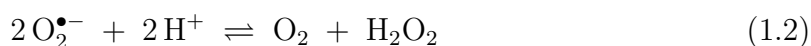
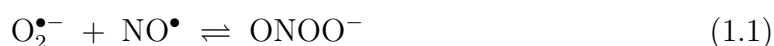
Obrázek 1.1: Schéma postupné redukce kyslíku na vodu skrze reaktivní intermediáty. (podle [4])

Molekula kyslíku je v základním – tripletovém ( $^3\Sigma_g^-$ ) – stavu ve formě biradikálu [4], z tohoto důvodu je pravděpodobnost, že dojde k přímé reakci s organickými sloučeninami obsahujícími povětšinou spárované elektrony, velmi nízká [10]; dikyslík podléhá převážně reakcím probíhajícím radikálovými mechanismy nebo může podstoupit monovalentní redukci (např. iontem přechodného kovu) [5]. Tato tzv. kinetická bariéra – termodynamicky jsou totiž reakce kyslíku s organickými sloučeninami velmi výhodné – nejspíše také umožnila dlouhodobější setrvání života na Zemi.

Tripletový kyslík je možné elektronově excitovat na stav singletový – označovaný  $^1O_2$  nebo také  $O_2(^1\Delta_g)$  – (na obr. 1.1) [11], ve kterém jsou všechny elektrony v molekule spárovány. Tato částice je vysoce labilní a velmi snadno podléhá reakcím s organickými sloučeninami. K excitaci na singletový stav může dojít např. absorpcí elektromagnetického záření či v živých systémech také přenosem energie z jiných excitovaných molekul (tripletové stavy chlorofylů apod.) [5]. Singletový kyslík může rovněž vznikat metabolickými reakcemi, kterými se běžně tvoří kyslík tripletový, a to v případě že nevyužitá

/ nadbytečná reakční energie přímo excituje nascentní tripletový kyslík na singletový.

Pokud kyslík přijme jeden elektron, vzniká superoxidový anionradikál  $O_2^{\bullet-}$  (obrázek 1.1 na předchozí straně). Pro svůj náboj superoxid neprochází přes biologické membrány [8]. Radikálový charakter superoxidu způsobuje, že podobně jako u tripletového kyslíku je pravděpodobnost reakcí s biologickými strukturami velmi nízká [4], naproti tomu však superoxid může podlehnout reakcím s radikály, např. s oxidem dusnatým za vzniku reaktivního peroxynitritu (rovnice 1.1) [7] či s druhým superoxidem v procesu tzv. dismutace (rovnice 1.2), nebo může přímo oxidovat/redukovat ionty přechodných kovů (enzymem velmi náchylným k redukci je třeba akonitasa [7]).



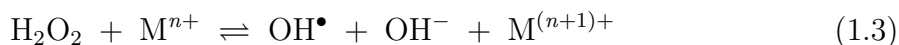
Protonací superoxidu může vznikat hydroperoxyl  $HO_2^{\bullet}$  (obr. 1.1 na předchozí straně), jež je vysoce reaktivní vůči biologickým strukturám [5], avšak při fyziologických hodnotách pH je tato protonace nevýhodná [4].

Dalším stupněm redukce je přechod superoxidu na peroxidový anion, resp. při současné protonaci na peroxid vodíku  $H_2O_2$  (obrázek 1.1 na předchozí straně) – molekulu, v níž jsou již všechny elektrony spárovány.

Peroxid vodíku je v organismu eliminován účinkem katalasy či tzv. Halliwellovou-Asadovou dráhou (na obr. 1.2 na straně 12 v pravé dolní části) [1], která pro redukci využívá kyseliny askorbové a glutathionu a jejich (enzymatických) transformací.

Předposledním intermediátem vznikajícím jednelektronovou redukcí peroxidu vodíku je hydroxylový radikál  $OH^{\bullet}$  (na obr. 1.1 na předchozí straně); ten je ze všech částečně redukováných ROS tím nejreaktivnějším [5, 10] a tudíž i nejnebezpečnějším pro biologické systémy. Velice snadno reaguje se všemi sloučeninami, jež mohou HAT mechanismem (vizte dále) poskytnout atom vodíku – z hydroxyly se tak stává voda a druhým produktem reakce je organický radikál.

Hydroxylový radikál přirozeně vzniká účinkem neenzymatické katalýzy v procesu zvaném Haberův-Weissův cyklus (vlevo uprostřed na schématu 1.2 na straně 12) [1, 8]. Hlavní částí tohoto procesu je Fentonova reakce, tj. reakce peroxidu vodíku s železnatým či mědným iontem spojená se vznikem hydroxyly a hydroxidu (rovnice 1.3),





přičemž pokud je v reakčním prostředí přítomen i superoxidový anionradikál, dojde ke zpětné redukci přechodného kovu na nižší mocenství a tím k obnovení jeho katalytické aktivity (rovnice 1.4) – cyklus se může dále opakovat za neustálé generace hydroxylového radikálu.

Ve světle této skutečnosti je každý antioxidant také potenciálním nepřímým oxidantem – tzv. prooxidantem [9]. Prooxidativní vlastnost vyplývá právě ze schopnosti antioxidantů redukovat jinak stabilní železitý či měďnatý ion a tím umožnit průběh Fentonovy reakce. Při vyšší koncentraci antioxidantu se tato vlastnost projeví silněji a může dokonce úplně zastínit jeho ostatní, veskrze pozitivní, účinky.

Mezi hlavní zdroje ROS v buňkách patří mitochondriální dýchací řetězec (komplex I a III) a elektronový řetězec fotosystémů v chloroplastech (naznačeno na obr. 1.2 na následující straně) [3, 8], dále pak enzymy glykolát oxidasa, lipoxxygenasy, xanthin oxidasy, NADPH oxidasy [10] a cytochromy P450 [4, 5] nebo např. procesy  $\beta$ -oxidace mastných kyselin a excitované stavy chlorofylů (přechod singletového stavu na tripletový).

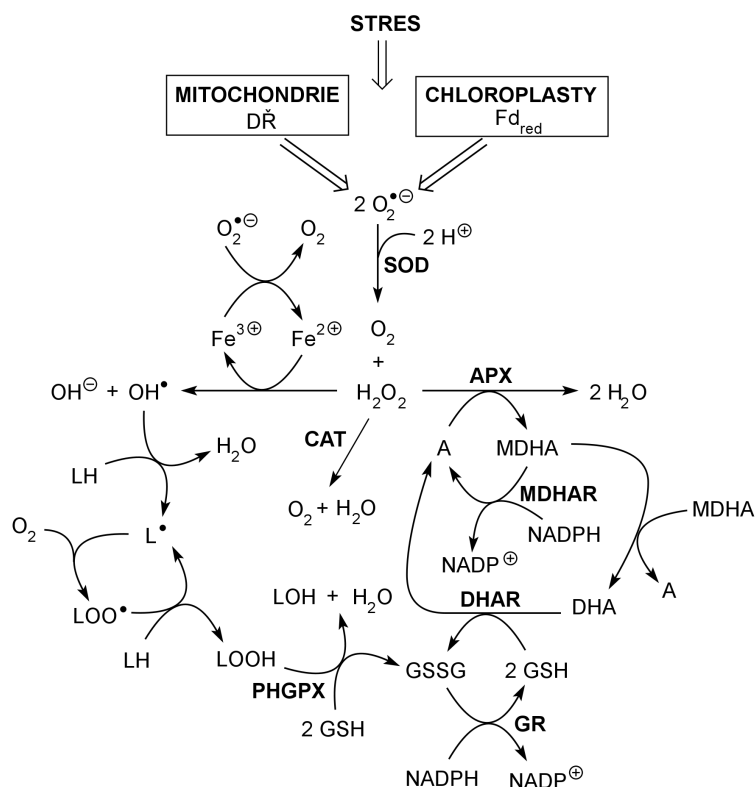
### 1.1.2 Poškození biologických molekul

Jak již bylo zmíněno, riziku oxidativního poškození jsou vystaveny všechny důležité složky biologických struktur: lipidy, nukleové kyseliny, proteiny a rovněž sacharidy [10].

Peroxidace lipidů a oxidativní poškození DNA jsou u živočichů negativně spojovány s některými onemocněními (rakovina, ateroskleróza, cukrovka) a nejspíše také přímo souvisejí se stárnutím organismu [2].

Peroxidace polynenasycených mastných kyselin účinkem enzymů lipoxxygenas (LOX) je přirozeným procesem [10], naproti tomu její neenzymatická varianta zprostředkovaná působením kyslíkatých radikálů je spíše nežádoucí.

Velmi účinným iniciátorem peroxidace lipidů je hydroxylový radikál [10]. Jeho reakcí se systémem dvojných vazeb v molekule mastné kyseliny (např.  $\alpha$ -linoleátu) LH dojde ke vzniku lipydylového radikálu  $\text{L}^\bullet$  (vlevo dole na schématu 1.2 na následující straně), jenž jako radikál dále ochotně reaguje s kyslíkem v tripletovém stavu za tvorby radikálu lipidperoxylového  $\text{LOO}^\bullet$  – tento pak podobně jako radikál hydroxylový odtrhne atom vodíku z molekuly dalšího lipidu a propagační cyklus peroxidace se neustále opakuje, přičemž stoupá množství lipidhydroperoxidů  $\text{LOOH}$ , jež mohou dále různě přesmykovat či se degradovat na další reaktivní molekuly (např. lipidalkoxylové radikály  $\text{LO}^\bullet$ ) a poškozovat další součásti membrány. Terminace tohoto procesu je možná



Obrázek 1.2: Celkový pohled na základní metabolismus reaktivních forem kyslíku. (vysvětlení jednotlivých oblastí v textu; podle [1, 3]) Shora: DŘ ... dýchací řetězec,  $Fd_{red}$  ... redukovaný ferredoxin, SOD ... superoxididismutasa, CAT ... katalasa, APX ... askorbátperoxidasa, A ... askorbát, MDHA ... monodehydroaskorbát, MDHAR ... monodehydroaskorbátreduktasa, DHA ... dehydroaskorbát, DHAR ... dehydroaskorbátreduktasa, GSH ... glutathion, GSSG ... glutathiondisulfid, GR ... glutathionreduktasa, LH ... lipid (fosfolipid), PHGPX ... fosfolipidhydroperoxidglutathionperoxidasa

tehdy, je-li přítomna další látka – antioxidant – jež je schopna poskytnout  $L^\bullet$  či  $LOO^\bullet$  radikálu atom vodíku a jejíž následná radikálová struktura je zároveň patřičně (rezonančně) stabilizována; dobrými terminátory peroxidace jsou tudíž tokochromanoly nebo askorbát. Další varianty terminace zahrnují vznik dimerů (LL) či endoperoxidů (LOOL) [5].

Hlavními důsledky peroxidace lipidů v membráně je snížení její fluidity [5], možná denaturace transmembránových proteinů a celkové zvýšení propustnosti membrány pro látky, jež by jí za normálních okolností neprocházely.

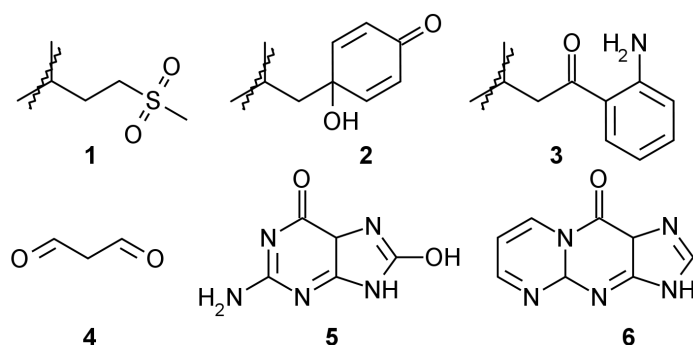
Poměrně důležitou v rostlinách přirozeně se vyskytující skupinou látek souvisejících s ROS jsou reaktivní elektrofilní sloučeniny (RES, z angl. *reactive electrophilic species*) [12], mezi něž patří hlavně  $\alpha,\beta$ -nenasycené karbonyly malondialdehyd (MDA, 4 na obr. 1.3 na následující straně) a 2-(*E*)-hexenal, které mohou pomocí reakcí s nukleovými kyselinami a proteiny indukovat mechanismy vedoucí k mobilizaci obranných systémů (hojení, přežití stresu); naopak při velmi zvýšeném stresu může jejich nadpro-

dukce vyvolat až buněčnou smrt. Některé RES vznikají enzymatickou činností, avšak např. MDA vzniká nekatalyzovaně v rámci procesu peroxidace lipidů – tedy primárně účinkem ROS – a tímto způsobem zpětnovazebně zvyšuje odolnost rostliny při vyšším oxidativním stresu. Peroxidace lipidů dává u rostlin vzniknout také skupině látek strukturně připomínajícím eikosanoidy – tzv. fytoprostanům [12, 13].

Proteiny podléhají reakcím se všemi formami ROS prostřednictvím různých mechanismů [5, 11]. Společným rysem je však většinou prvotní adice reaktivní částice na postranní řetězce aminokyselin, která následně zapříčiní další degradační přeměny těchto (přesmyky, hydrolýzy apod.). Výsledkem oxidativních změn může být až fragmentace peptidového řetězce či jeho zesílení (včetně spojení s jiným proteinem) [4, 11], v případě enzymů pak dochází k jejich inaktivaci. Vzhledem k velkému množství proteinů a peptidů v buňce jsou právě proteiny nejčastěji napadanými biologickými strukturami.

Mezi aminokyseliny „nejpostiženější“ účinky ROS patří tryptofan, tyrosin, histidin, methionin a cystein (resp. cystin) [11]. Některé z degradačních produktů aminokyselin jsou uvedeny na obr. 1.3. Obecně lze říci, že sirné aminokyseliny podléhají tvorbě oxoderivátů (sulfoxidů, sulfonů, sulfinových kyselin apod.) a aminokyseliny histidin a tryptofan rozpadu heterocyklických kruhů (v případě histidinu vznikají např. močovina a malondiamid, v případě tryptofanu kynurenin).

Jako indikace oxidativního poškození proteinů slouží jejich stupeň karbonylace [5], tj. množství produktů reakcí karbonylových skupin nově vzniklých během působení ROS s ostatními složkami proteinu – schopnost karbonylace je typická kromě histidinu a tryptofanu mimo jiné i pro arginin, prolin a lysin, resp. příslušné semialdehydy z nich vzniklé.



Obrázek 1.3: Některé z produktů degradace aminokyselin, mastných kyselin a nukleobází účinkem ROS. (podle [5, 11]) Shora: produkty cysteinu (1), tyrosinu (2), tryptofanu (3),  $\alpha$ -linoleátu (4) a guaninu (5 účinkem  $\text{OH}^\bullet$  a 6 účinkem MDA)

Nukleové kyseliny jsou napadány hlavně singletovým kyslíkem a hydroxylovým radikálem [5] – produkty jsou různě oxidované báze (hydroxy- a oxoderiváty – příklad na obr. 1.3 na předchozí straně) či dochází až k rozštěpení kruhů a tvorbě dalších degradačních produktů. Poškozeny mohou být i sacharidové části nukleosidů. Stejně jako v případě proteinů i u nukleových kyselin hrozí fragmentace řetězce nebo zesíťování [4].

## 1.2 Antioxidační látky

V následující části budou představeny některé skupiny antioxidačních látek přírodního (převážně rostlinného) původu a budou nastíněny nejčastější mechanismy jejich antioxidačního působení.

Biologické antioxidanty jsou definovány jako látky, které již při nízké koncentraci dokáží zabránit nebo oddálit oxidaci ostatních přítomných látek [14].

Ačkoli je v literatuře popsáno nesčetné množství konkrétních mechanismů antioxidačního působení rozličných druhů látek, všem je společný jeden proces – a to redukce elektronem (mechanismus SET – *single electron transfer*) či atomem vodíku (mechanismus HAT – *hydrogen atom transfer*).

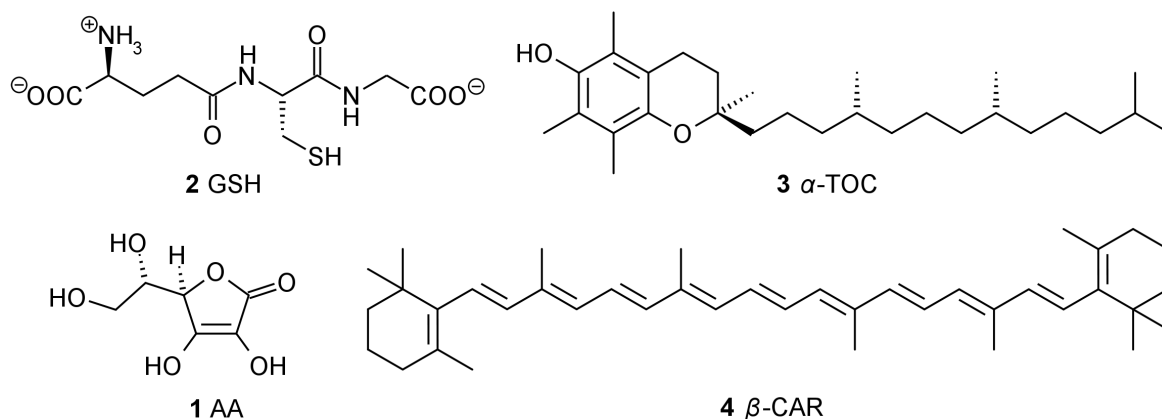
Uplatnění SET nebo HAT mechanismu je závislé na řadě faktorů, nejdůležitější z nich jsou samotná chemická struktura antioxidantu, rozpouštědlo a s tím související pH [15, 16]. Přenos atomu vodíku je rychlý v nepolárních rozpouštědlech, v protickém polárním prostředí se téměř neuplatňuje. Naopak přenos elektronu probíhá velmi rychle v protickém prostředí, zvláště pak v zásadité oblasti pH (deprotonace atomů vodíku usnadňuje následné odštěpení elektronu).

Hlavní funkce přírodních antioxidantů lze shrnout především na ochranu fotosyntetického aparátu, DNA, proteinů a udržování membránové intaktnosti [8].

### 1.2.1 Kyselina askorbová, glutathion a antioxidační enzymy

V živých organizmech hrají nezastupitelnou úlohu dva hlavní antioxidanty – derivát sacharidového původu kyselina askorbová a tripeptid glutathion – obě tyto látky jsou polární a jejich pole působnosti tedy leží hlavně v cytosolu a uvnitř buněčných kompartmentů [6, 10], kde se vyskytují v řádově mM koncentracích [3]. Jejich antioxidační účinky jsou v rámci Halliwellovy-Asadovy dráhy (na schématu 1.2 na straně 12) vzájemně zprostředkovány řadou enzymů [1, 8, 10]. Konečným reduktantem je ve většině případů redukovaný koenzym nikotinamiddinukleotid(fosfát) (NAD(P)H), resp. slouží k obnovení antioxidační funkce kyseliny askorbové a glutathionu [8].

Dalšími antioxidačními enzymy jsou pak superoxiddismutasa, katalasa a rozličné druhy peroxidasy, např. guajakolperoxidasa [1, 10].



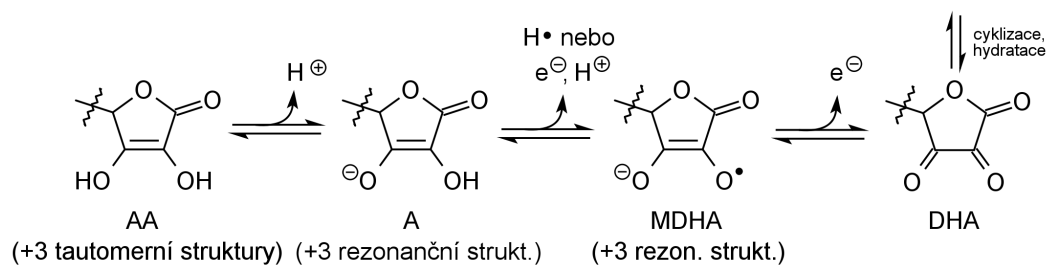
Obrázek 1.4: Primární metabolity hrající roli v eliminaci ROS. (podle [7]) **1** ... kyselina askorbová, **2** ... glutathion, **3** ...  $\alpha$ -tokoferol, **4** ...  $\beta$ -karoten

Kyselina L-askorbová neboli vitamin C (AA, struktura **1** na obr. 1.4) je ve vodě rozpustná látka vyskytující se napříč všemi organismy (je přítomna ve všech kompartmentech [17]); „kyselost“ ( $pK_a$  4,2 [7]) i antioxidační aktivitu jí propůjčuje tzv. reduktonové uspořádání [6], tj. tautomerně stabilizované sousedství endiolu a karbonylové skupiny (zde karbonylové skupiny laktonu) – díky tomuto dochází ke snadné deprotonaci endiolové hydroxyskupiny na askorbátový anion (A, obr. 1.5 na následující straně). Askorbát je výjimečný tím, že dokáže při reakcích s ostatními látkami odevzdat pouze jeden elektron [6].

Jednoelektronová oxidace (schéma na obr. 1.5 na následující straně) askorbátu může proběhnout HAT i SET mechanismem [17], v prvním kroku vzniká monodehydroaskorbát (MDHA), což je podstatou rezonančně velmi stabilizovaný anionradikál. Pokud dojde navíc k přenosu druhého elektronu na reakčního partnera, v molekule se obnoví neutralita a vzniká dehydroaskorbát (DHA)<sup>1</sup> – 1,2,3-triketonová sloučenina, jež postupně podléhá tvorbě hemiketalu s postranním glykolovým řetězcem nebo adici vody (vznikají geminální alkoholy) a následně i nevratné degradaci na množství produktů (mezi nimi např. na oxalát a tartrát).

Dvě molekuly MDHA mohou spontánně projít disproportionační reakcí (rychlostní konstanta  $\sim 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ) [17], jejíž produkty jsou redukovaný askorbát a oxidovaný dehydroaskorbát (rovnice 1.5 na následující straně):

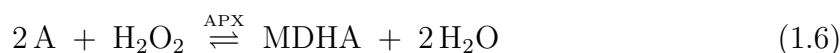
<sup>1</sup>Správně se již nejedná o kyselinu (sloučenina je pouze neutrální lakton), takže nemůže existovat ani její anion; zde je však použito „chybné“ pojmenování pro zachování kontinuity výkladu.



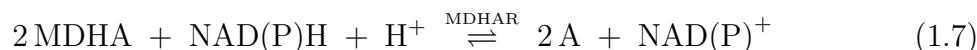
Obrázek 1.5: Postupná oxidace kyseliny askorbové. (podle [17]) MDHA ... monodehydroaskorbát, DHA ... dehydroaskorbát



Askorbát dokáže redukovat superoxidový i hydroxylový radikál a chemicky reagovat se singletovým kyslíkem nebo ozonem [17]; redukuje také peroxid vodíku účinkem enzymu askorbátperoxidasy (APX, EC 1.11.1.11) [1, 10], jež je přítomný ve všech kompartmentech rostlinné buňky [3],



přičemž vzniklý MDHA buď samovolně disproportionuje nebo je enzymem monodehydroaskorbátreduktasou (MDHAR, EC 1.6.5.4) za spotřeby NAD(P)H redukován zpět na askorbát:



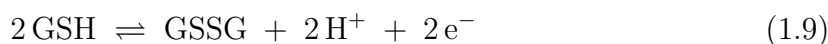
V chloroplastech existuje navíc možnost přímé redukce MDHA pomocí ferredoxinu [8].

Alternativně může vzniklý dehydroaskorbát být zpět redukován na askorbát reakcí katalyzovanou dehydroaskorbátreduktasou (DHAR, EC 1.8.5.1) [10], při níž jsou oxidovány dvě molekuly glutathionu na glutathiondisulfid (GSSG):



Glutathion (GSH, **2** na obr. 1.4 na předchozí straně) je tripeptidická molekula tvořená aminokyselinami glutamátem, cysteinem a glycinem [17, 10]. Díky přítomnosti cysteinu a jeho thiolové skupiny má tato sloučenina schopnost se enzymaticky oxidovat za tvorby disulfidického spojení – glutathiondisulfidu (GSSG) [3]. Přeměna GSH na GSSG poskytuje reakčnímu protějšku dva elektrony, resp. dva atomy vodíku ( $\text{H}^+$  a  $e^-$ );





nejčastěji redukovanými sloučeninami jsou v tomto případě peroxid vodíku a organické hydroperoxy (primárně hydroperoxy lipidů), a to za katalýzy enzymy glutathionperoxidasou (GPX, EC 1.11.1.9) nebo případně (fosfo)lipidhydroperoxidglutathionperoxidasou (PHGPX / LHGPX, EC 1.11.1.12) [1]:



Regenerace redukovaného glutathionu se odehrává za katalýzy enzymem glutathionreduktasou (GR, EC 1.8.1.7) a spotřebuje se při ní NADPH (rovnice 1.11) [17, 10].

Ačkoliv je spontánní dismutace superoxidu (rovnice 1.2 na straně 10) z kinetického hlediska poměrně rychlý proces (rychlostní konstanta při pH 7  $\sim 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ) [7], při nízkých koncentracích je střední doba života superoxidu natolik dlouhá, že by mezitím mohlo dojít k reakci s některou z důležitých součástí buňky. Z tohoto důvodu je nutná univerzální přítomnost enzymu superoxiddismutasy (SOD, EC 1.15.1.1) [3], jež katalyzuje reakci totožnou (rovnice 1.2 nebo obrázek 1.2 na straně 12), a to cca 10000krát vyšší rychlostí [5], a udržuje tak koncentraci superoxidu na nezbytně nízké úrovni.

Katalasa (CAT, EC 1.11.1.6) je enzym přítomný v peroxisomech [3], kde katalyzuje dismutaci peroxidu vodíku na molekulární kyslík a vodu (rovnice 1.12). Výhodou katalasy je, že stejně jako superoxiddismutasa má vysoké číslo přeměny [5]; superoxid a následně i peroxid jsou díky SOD a CAT eliminovány bez nutnosti použití redukováných koenzymů.



V buněčné stěně rostlin působí enzymy zvané CW peroxidasy (angl. *cell-wall peroxidases*), mezi něž patří i guajakolperoxidasa (GuPX) [1], jež se podílí na eliminaci peroxidu vodíku v procesu lignifikace buněčné stěny – donory elektronů pro jeho redukci jsou v tomto případě fenolické látky (flavonoly a fenypropanoidy).

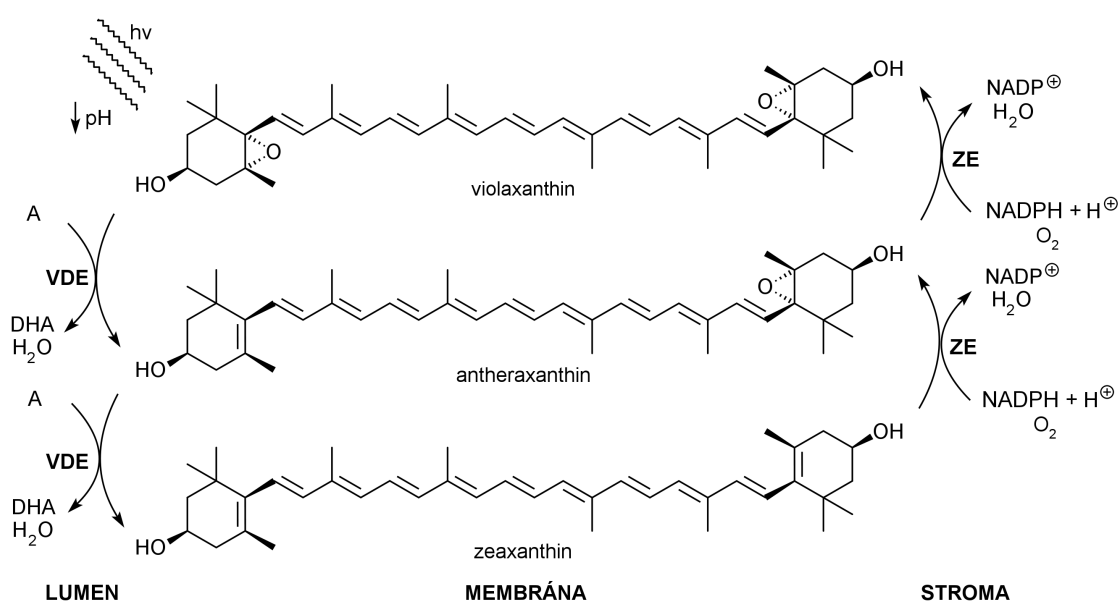
Na membráně uvnitř lumen thylakoidů a matrixu mitochondrií se vyskytují tzv. alternativní oxidasy (AOX) [3], jež katalyzují redukci kyslíku na vodu a pro tuto reakci využívají redukovaného plastochinonu či ubiquinonu – svojí činností odebírají



$\alpha$ -tokoferol rovněž ochotně reaguje se singletovým kyslíkem; vzniká 8-hydroperoxy- $\alpha$ -tokoferon, jež se může stejně jako v předchozím případě rozpadnout na tokochinon.

Karotenoidy se rozdělují na karoteny, polyenové uhlovodíky, a xanthofyly, jež jsou vlastně různě oxidované formy karotenů [7]. Díky poměrně rozsáhlému systému konjugovaných dvojných vazeb mohou karotenoidy v procesu zvaném nefotochemické zhášení odebrat excitační energii singletového stavu kyslíku či tripletového stavu chlorofylů a samy tak přejít do stavu tripletového [4]. Do základního stavu se poté karotenoidy dostávají nezářivě pomocí rotačně-vibračních přechodů – takto dochází k disipaci nadbytečné energie, která by jinak prostřednictvím singletového kyslíku poškodila biologické struktury.

Nejrozšířenějším zástupcem karotenů je  $\beta$ -karoten (4 na obr. 1.4 na straně 15), jehož role přísluší převážně energetické disipaci energie a reakce s peroxyly [4]. Mezi nejdůležitější xanthofyly se pak řadí violaxanthin a zeaxanthin, jež se výrazně podílejí na disipaci nadbytku sluneční energie v tzv. xanthofylovém cyklu (obr. 1.7) [8]. V důsledku silné intenzity přichozícího záření klesá pH v lumen thylakoidů a tento pokles aktivuje enzym violaxanthindeepoxidasu (VDE, EC 1.10.99.3), jež katalyzuje dvě po sobě jdoucí přeměny violaxanthinu přes intermediát antheraxanthin na úplně de-epoxidovaný zeaxanthin; během celkové reakce se využijí dvě molekuly askorbátu, jež se oxidují na DHA [17]. Na druhé straně membrány probíhá reakce opačná, tj. epoxidace, katalyzovaná enzymem zeaxanthinepoxidasou (ZE, EC 1.14.13.90) za spotřeby dvou molekul NADPH a kyslíku.



Obrázek 1.7: Xanthofylový cyklus v chloroplastech. (podle [8, 18]) A ... askorbát, DHA ... dehydroaskorbát, VDE ... violaxanthindeepoxidasa, ZE ... zeaxanthinepoxidasa

### 1.2.3 Sekundární metabolity

Přírodní látky nebo v užším smyslu slova sekundární metabolity představují širokou a co se týče chemické struktury velice rozmanitou skupinu sloučenin, jež jsou produkty převážně rostlin, hub a některých mikroorganismů – často se jedná o organizmy s částečně nebo úplně omezenými pohybovými schopnostmi [19]. Podle čistě opisné definice se jedná o látky, které se přímo nepodílejí na běžném růstu, vývoji ani rozmnožování organismu [19, 1], a tímto se odlišují od primárních metabolitů, jejichž někteří zástupci s antioxidačními vlastnostmi byli popsáni výše.

I přes mírně zavádějící přívlastek „sekundární“ hrají tyto látky důležitou roli nejen v životě svých přímých producentů, ale také většiny dalších organismů včetně člověka. Živočichové a ostatní organoheterotrofové totiž přijímají v potravě vedle nezbytně nutných živin v podobě proteinů, lipidů a sacharidů, vitaminů apod. také nezanedbatelné množství těchto přírodních látek, jež sice přímo nejsou vázány na přežití jedince, ale určitým způsobem ho mohou ovlivňovat – u některých skupin je toto ovlivnění dobře popsáno, u jiných se zatím jedná pouze o nepotvrzené domněnky. Sekundární metabolity výrazně rozšiřují celkovou rozličnost živého světa, neboť biologická diverzita jde ruku v ruce s diverzitou chemickou [19].

V každém případě již dnes nelze souhlasit s dřívějšími představami, že sekundární metabolity jsou pouhou hříčkou přírody, plýtváním či dokonce odpadem (dříve byly často označovány jako „*products of metabolism overflow*“ [19]), i když se tak na první, nezkoumavý, pohled může zdát; jejich *raison d'être* nemusí být vždy člověku znám. Podobnosti a celkové provázanosti se základními metabolity navíc přidává i fakt, že leckteré primární i sekundární metabolity procházejí při své syntéze stejnými biochemickými drahami [20].

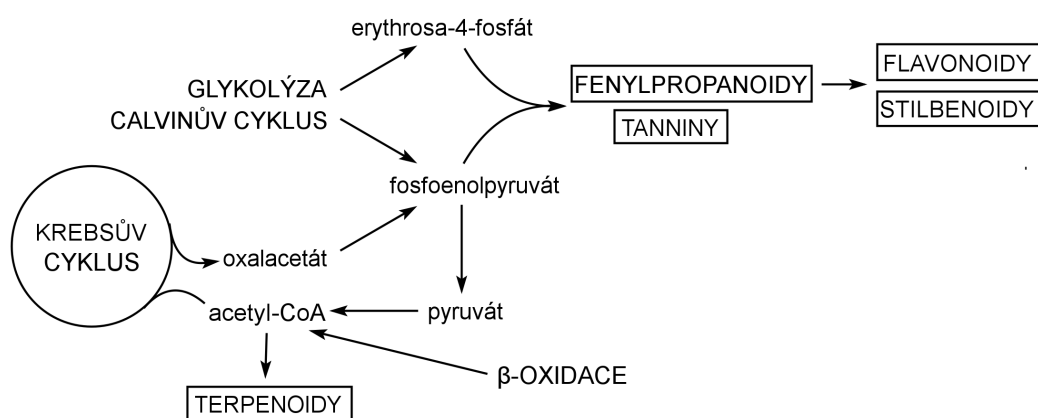
Všeobecně se přírodní látky rozdělují na velké třídy a podtřídy, jež v sobě zahrnují sloučeniny s podobným biosyntetickým původem nebo při klasickém způsobu třídění pak sloučeniny s podobnými fyzikálně-chemickými či chemickými vlastnostmi.

Mezi základních tři skupin přírodních látek patří [1, 7]:

1. alkaloidy, jež jsou tvořeny různě derivatizovanými aminokyselinami a jejichž společným rysem je přítomnost dusíku (často heterocyklicky vázaného),
2. terpenoidy (izoprenoidy), které se charakterizují jako formální polymery izoprenu, a
3. fenolické látky, jež v sobě zahrnují širokou skupinu sloučenin obsahujících hydroxyaryl.

Z hlediska antioxidačních vlastností jsou z vyjmenovaných zajímavé terpenoidy a především fenolické látky; v dalším textu proto bude na tyto kladen důraz.

Biosyntéza sekundárních metabolitů vychází ve svých úplných začátcích ze základních biochemických procesů jakými jsou Calvinův cyklus, Krebsův cyklus,  $\beta$ -oxidace mastných kyselin nebo glykolýza (obrázek 1.8). Šikimátová dráha vedoucí k fenolickým látkám, např. fenypropanoidům, tanninům a flavonoidům, vychází z produktů glykolýzy, příp. pentosafosfátové dráhy [21]. K syntéze terpenoidů slouží mevalonátová dráha [20], jež má jako výchozí látku acetylkoenzym A, nebo alternativní methylethylerythritol-fosfátová dráha (na obrázku 1.8 není znázorněna) využívající produktů glykolýzy nebo Calvinova cyklu.



Obrázek 1.8: Zasazení biosyntézy vybraných sekundárních metabolitů do kontextu intermediárního metabolismu. (podle [18])

Terpenoidy neboli izoprenoidy se v nějaké podobě vyskytují u všech živých organismů. Jejich společnou charakteristikou je, že se jedná o látky převážně hydrofobní povahy (proto jsou někdy řazeny k lipidům) a dále je u většiny z nich dodrženo izoprenové (C5) pravidlo [7], tj. celkový počet atomů uhlíku ve strukturách čistě izoprenoidního původu (tedy vyjma konjugátů a podobně modifikovaných) je celočíselným násobkem pěti, přičemž se častěji vyskytují sudé násobky.

U rostlin existují dva hlavní postupy syntézy terpenoidů, převážně cytosolární mevalonátová dráha (syntéza triterpenů, seskviterpenů, sterolů, ...) a striktně plastidová methylethylerythritolfosfátová dráha (syntéza karotenoidů, kyseliny abscisové, gibberelinů, fytanů a dalších) [20]; mezi oběma drahami však zřejmě může docházet k metabolické výměně.

Terpeny jsou s počtem nad 25000 popsanych chemických individuů (rok 2007) největší skupinou přírodních látek [19]. Rostlinám slouží především jako repelenty nebo deterenty proti býložravcům a škůdcům a jako atraktanty opylovačů a parazitoidů;

vykazují rovněž antifungální a antibakteriální účinky.

Tabulka 1 obsahuje seznam některých rostlin použitých v této práci s uvedením jejich hlavních obsahových látek (převážně sekundárních metabolitů).

Tabulka 1: Obsahové látky některých ze studovaných rostlin.

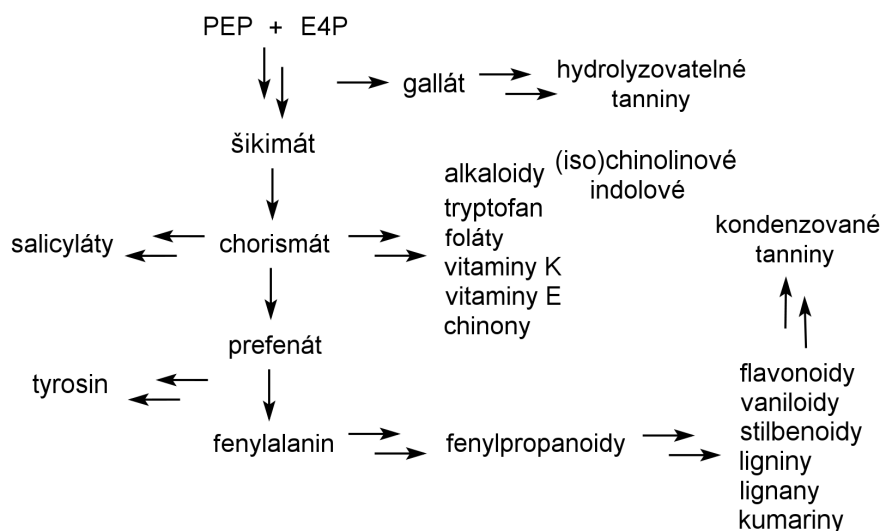
rostlina	obsahové látky [22, 23, 24]
brukev	S-glukosinoláty
cibule	S-allyl-, S-propyl- a S-methylcystein-sulfoxidy, flavonoidy (kvercetin), glutamát, arginin, vitamin C
čajovník	flavonoidy, třísloviny (katechiny), alkaloidy (kofein, theofylin)
dobromysl	silice (karvakrol, thymol), tanniny, fenolické kyseliny, flavonoidy
galgán	silice (1,8-cineol, methylcinnamát), acetoxychavikol-acetát, diterpeny (galan A, B), flavonoidy (galangin, kempferid)
hluchavka	flavonoidy, třísloviny
jablečník	hořčiny (marrubin), třísloviny
jitrocel	iridoidy (aukubin, katalpol), fenylethanoidy (akteosid), triterpeny
kurkumovník	kurkuminoidy (kurkumin, desmethoxykurkumin), seskviterpeny (turmeron, zingiberen)
levandule	silice (linalyl-acetát, linalool), flavonoidy, fenolické kyseliny (rozmarýnová, chlorogenová), kumariny
máta	silice (menthol, menthon, menthofuran), flavonoidy
mateřídouška	silice (thymol, p-cymen, karvakrol), flavonoidy (apigenin, luteolin), kyselina rozmarýnová
miřík	furokumariny (psoralen)
pampeliška	eudesmanolidy (taraxakolid), germakranolidy (kys. taraxinová), taraxakosid, triterpeny
routa	flavonoidy (rutin), furokumariny (bergapten, xanthotoxin)
řebříček	hořčiny (achillin)
ředkev	anthokyaniny (pelargonidin), S-glukosinoláty
řepík	flavonoidy, třísloviny
šalvěj	silice (cineol, borneol, thujon), diterpeny (karnosol, kys. karnosová, rosmanol), kyselina rozmarýnová, flavonoidy
vlaštovičník	alkaloidy (chelidonin, sanguinarin), kyselina chelidonová
zázvor	silice (zingiberen, kurkumen), gingeroly

### 1.2.3.1 Fenolické látky

Fenolické látky jsou bezpochyby největší skupinou přírodních látek s antioxidačními vlastnostmi (popsáno několik tisíc struktur [6]); svůj původ odvozují od fosfo-

enolpyruvátu a erythrosa-4-fosfátu [21]. Odhaduje se, že evolučně velmi starobylou a konzervovanou šikimátovou dráhou prochází 20 až 50 % veškerého fixovaného uhlíku – a tento uhlík je ve velké míře uložen jako lignin v buněčných stěnách rostlin.

Šikimátová dráha slouží nejen pro syntézu široké skupiny sekundárních metabolitů, ale stejně tak pro syntézu důležitých primárních metabolitů jako jsou aromatické aminokyseliny fenylalanin, tyrosin a tryptofan nebo koenzymy pterinové a chinonové řady (obr. 1.9). Savci včetně člověka možností šikimátové dráhy využít nemohou [21], proto je klíčovým zdrojem jmenovaných esenciálních látek jejich potrava.



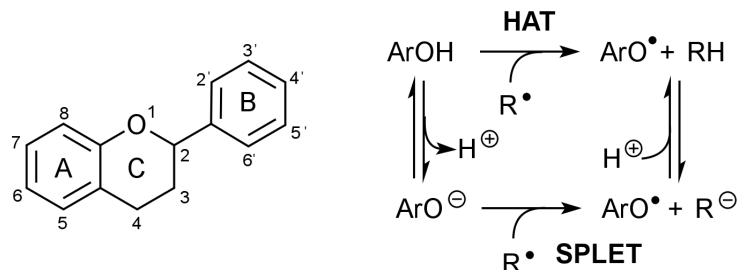
Obrázek 1.9: Hlavní produkty šikimátové dráhy. (podle [18]) PEP ... fosfoenolpyruvát, E4P ... erythrosa-4-fosfát

Mezi hlavní funkce fenolických sekundárních metabolitů patří ochrana před UV zářením (díky systému konjugovaných vazeb), chelatace iontů kovů ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  apod.) a antioxidační aktivita (účinné proti všem druhům ROS) [1]. Množství produkovaných fenolických látek (zvláště flavonoidů) je rovněž zvýšeno během stresu [1, 5].

Některé z fenolických látek jsou považovány za účinnější antioxidanty než kyselina askorbová či tokoferoly [10]. Tento fakt je podpořen tím, že ve sloučeninách se mnohdy vyskytuje více než jedna hydroxyskupina (tj. potenciální donor vodíku), výsledné radikály odvozené od těchto sloučenin jsou značně stabilizované (delokalizací nepárového elektronu po celém konjugovaném systému) a navíc některé dokáží vytvářet pevné komplexy s potenciálně prooxidativními ionty kovů, např.  $\text{Fe}^{2+}$ .

Pro antioxidační vlastnosti flavonoidů je důležitá přítomnost těchto strukturních motivů (na obr. 1.10 na následující straně je flavanový skelet s vyznačenou konvencí číslování atomů): 3',4'-katecholové uspořádání na kruhu B, dále 2,3-dvojná vazba, 3-hydroxyskupina a 4-karbonylová skupina na kruhu C a 5,7-dihydroxy uspořádání na kruhu A [25]. Jmenované strukturní součásti jsou mezi sebou provázány konjugací

(rezonancí) a jakmile některý z motivů chybí, snižuje se příslušně i antiradikálová aktivita. Častá je modifikace 3-OH skupiny glykosylací či esterifikací a 7-OH skupiny glykosylací.



Obrázek 1.10: Číslování flavanového skeletu a mechanizmy HAT a SPLET. (podle [6])  
ArOH ... fenolická látka, R• ... radikál

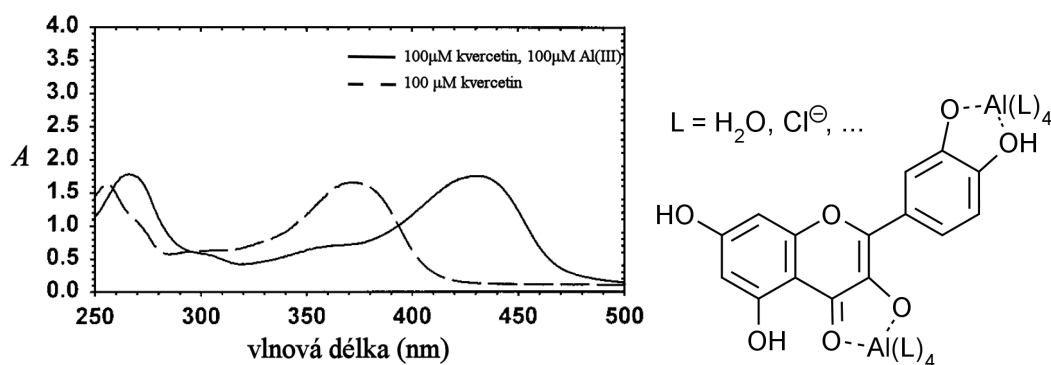
Flavonoidy a další fenolické látky při reakci s radikály v závislosti na prostředí využívají HAT i SET mechanismu [6]. V polárním prostředí převažuje variace mechanismu SET nazývaná přenos elektronu s postupnou ztrátou protonu (SPLET, *sequential proton loss electron transfer*, na obr. 1.10). Výsledný fenoxylový radikál je stabilizovaný delokalizací v rámci systému dvojných vazeb a dále také deprotonací některé z dalších hydroxyskupin.

Komplexy flavonoidů s ionty kovů (ale i  $\text{Al}^{3+}$ ) poměrně silně absorbující elektromagnetické záření v UV a díky bathochromnímu posunu také ve viditelné oblasti a vykazující též silnou fluorescenci [26]. Spektrum jednoho z nejrozšířenějších flavonoidů, kvercetinu, a jeho komplexu s hlinitými ionty je uvedeno na obrázku 1.11 na následující straně; na témže obrázku je pak vyobrazena možná struktura tohoto komplexu zjištěná v prostředí methanolu; naproti tomuto byl ve vodném roztoku zjištěn molární poměr 1:1 [27]. Flavonoid se jako ligand při komplexaci chová bidentátně [26, 28], proto je nezbytné, aby byl přítomen strukturní motiv sousedství karbonylu a hydroxyly či katecholu – tato podmínka je splněna kromě kvercetinu např. i pro morin nebo kempferol [7].

Komplexotvorné vlastnosti flavonoidů využívá jedna z metod jejich analytického stanovení, tzv. metoda podle Dowda [27] a její pozdější modifikace. Při této metodě se nechá roztok zkoumaného vzorku reagovat s chloridem hlinitým a následně se měří absorbance při vlnové délce v oblasti 400–450 nm.

V souvislosti s komplexy flavonoidů s ionty kovů bylo také dokázáno, že tyto komplexy mají vyšší antioxidační aktivitu než volné molekuly [26], resp. dochází ke snížení jejich oxidačního potenciálu – nejspíše v důsledku destabilizace molekuly flavonoidu.





Obrázek 1.11: Absorpční spektra kvercetinu (čárkovaně) a komplexu kvercetin- $\text{Al}^{3+}$  (plynule) v methanolu ([28], upraveno) a struktura komplexu kvercetinu a hlinitými ionty (podle [26]).

Dlouhodobá konzumace potravin bohatých na fenolické sloučeniny je u člověka také nejspíše podstatou tzv. francouzského paradoxu [25], tedy všeobecně nízké incidence kardiovaskulárních chorob v kontrastu s vysokým podílem nasycených tuků v potravě.

### 1.3 Metody stanovení antioxidačních vlastností

Studium těchto vlastností *in vivo* je stále ještě experimentálně složité a zřejmě i finančně nákladnější, z toho důvodu zachycují metody zde popsané pouze možnosti *in vitro* testování antioxidační aktivity pomocí postupů čistě chemických s vědomím všech nevýhod, jež tento způsob přináší.

Při testování antioxidační aktivity rozlišujeme dva základní přístupy [15]: nekompetitivní a kompetitivní. Nekompetitivní způsob spočívá ve studiu izolovaného systému antioxidant–reaktivní částice. Naproti tomu u kompetitivního přístupu je do systému přidána i cílová látka, tedy látka, jež je za přirozených fyziologických podmínek reaktivní částicí poškozena (protein apod.) a dochází ke kompetici antioxidantu a této cílové látky při reakci s reaktivní částicí.

Prve zmíněný přístup je jednodušší na provedení, ale za určitých podmínek nemusí odpovídat realitě uvnitř organismu (buňky). Výhoda kompetitivního způsobu je výrazné přiblížení fyziologickým podmínkám, avšak za cenu nutnosti optimalizace poměru antioxidant–cílová látka–reaktivní částice a zvládnutí celkově složitějších postupů stanovení.

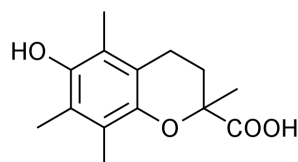
#### 1.3.1 Metody založené na přenosu elektronu či atomu vodíku

Metody, při nichž modelová látka (radikál, ...) reaguje s antioxidanty mechanismem HAT či SET, patří mezi ty nejpoužívanější [14, 16] a rovněž nejjednodušší a nejrychlejší

na provedení; při stanoveních se využívá většinou UV/VIS spektroskopie či fluorometrie.

Kapacita absorpce kyslíkatých radikálů (ORAC, *oxygen radical absorbance capacity*) a jí příbuzné metody využívají uměle generovaných reaktivních forem kyslíku ( $^1\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , ...) či dusíku ( $\text{ONOO}^-$  a  $\text{NO}^\bullet$ ) [15], přičemž průběh reakce je monitorován převážně fluorometricky (reaktivní částice reaguje s fluorescenčním indikátorem a zhasí jeho fluorescenci). V přítomnosti antioxidantu je intenzita či rychlost zhasení snížena.

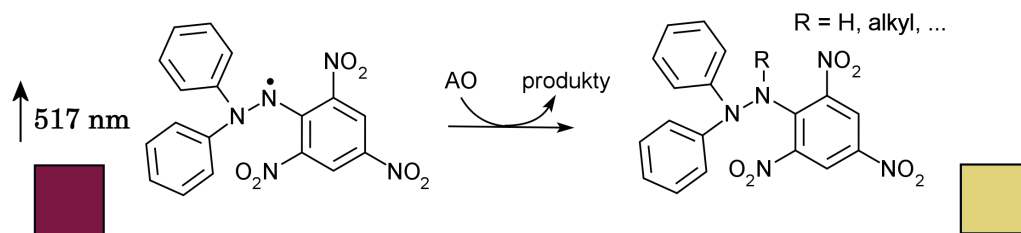
Metody stanovení antioxidační kapacity (AC) zahrnují použití „stabilních“ radikálů, odvozených od *N,N*-di(fenyl)pikrylhydrazinu (DPPH-H) nebo 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonátu) (ABTS) [14]. Výsledky se vyjadřují ve formě látkového množství či (méně vhodně) hmotnosti standardu vztažené na hmotnost výchozího materiálu (v případě rostlin na jejich sušinu) či v relativních jednotkách ( $\text{EC}_{50}$  apod.); při práci s čistými látkami je možné použít také vyjádření stechiometrického, tj. počtu molů zkoumané látky odpovídající určitému počtu molů redukovaného DPPH radikálu. Jako standard se většinou používá trolox (obr. 1.12), což je ve vodě lépe rozpustná syntetická varianta vitamínu E; v takovém případě se metody označují TEAC (*trolox equivalent antioxidant capacity*). Pro obě varianty stanovení je typický převážně SET mechanismus [15].



Obrázek 1.12: Struktura troloxu – standardu pro stanovení TEAC. (podle [7])

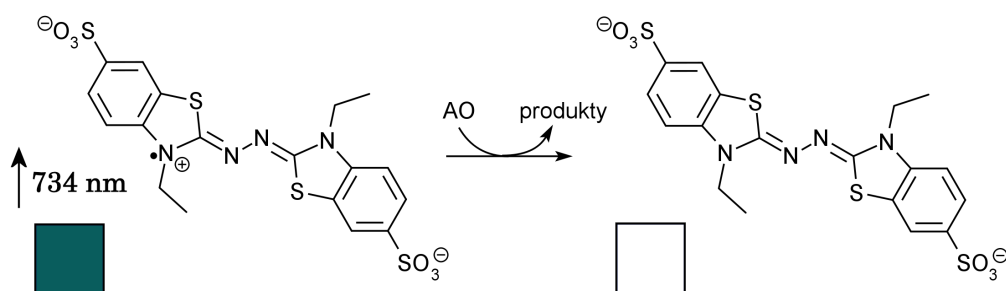
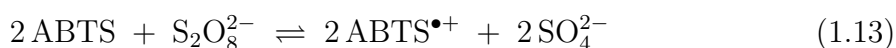
Stanovení TEAC s DPPH radikálem (absorpční koeficient  $\sim 12000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  (515 nm, ethanol) [29]) je často prováděno v polárním organickém rozpouštědle (ethanol či methanol) při vlnové délce cca 515 nm a využívá se čerstvě připraveného roztoku DPPH $^\bullet$ . Po redukci radikálové formy donorem atomu vodíku (antioxidantem) dojde k poklesu absorpance (zabarvení roztoku se mění z červenofialové na žluté, obr. 1.13 na následující straně). Mezi sloučeniny aktivní vůči DPPH radikálu patří kyselina askorbová, glutathion, vitaminy E, polyhydroxyaromatické sloučeniny a některé aromatické aminy [29]; sacharidy, aminokyseliny ani puriny a pyrimidiny neinterferují.

Oproti metodě TEAC s DPPH je varianta s kationradikálem ABTS (absorpční koeficient činí cca  $15000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  (734 nm, voda) [31]) prováděna ve vodném prostředí i v organických rozpouštědlech [16]. Roztok kationradikálu ABTS je připraven několik



Obrázek 1.13: Reakce DPPH radikálu s antioxidační látkou. (podle [30])

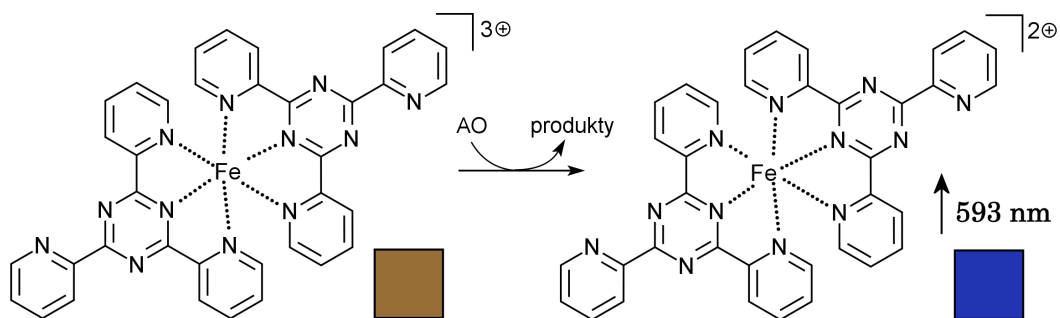
hodin předem reakcí ABTS s maximálně polovičním látkovým množstvím peroxysloučeniny (peroxodisíranu apod.; rovnice 1.13) [31]. V průběhu reakce s antioxidantem se pak sleduje pokles absorbance při vlnové délce 734 nm (roztok ztrácí modrozelené zabarvení a stává se postupně bezbarvým, obr. 1.14) či 415 nm.



Obrázek 1.14: Reakce ABTS kationradikálu s antioxidantem. (podle [14])

Při stanovení antiradikálových vlastností metodou ABTS nebo DPPH lze také v modernějším pojetí využít vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (HPLC) – je souběžně prováděna separace směsi na jednotlivé složky a zároveň reakce s modelovým radikálem, jež je monitorována spektrofotomericky; antioxidační vlastnosti se pak projeví jako negativní píky o různé intenzitě [32]. Výhoda spočívá v tom, že se zde narozdíl od celkového stanovení projeví individuální příspěvky jednotlivých sloučenin. V menším měřítku lze použít rovněž tenkovrstvé chromatografie.

Metoda FRAP (*ferric ion reducing antioxidant power*) je určená striktně pro kyselé vodné prostředí (pH okolo 3,6 pro udržení rozpustnosti) a využívá změny absorpčních vlastností při redukcí komplexu železitého iontu s 2,4,6-tripyridyl-*s*-triazinem (TPTZ) [16]; vzniklý komplex  $[\text{Fe}(\text{TPTZ})_2]^{2+}$  vykazuje silnou absorpci v okolí vlnové délky 593 nm (absorpční koeficient cca  $22000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  [33]). Metoda FRAP pracuje výhradně na principu SET mechanismu.



Obrázek 1.15: Reakce komplexu  $[\text{Fe}(\text{tptz})_2]^{3+}$  s donorem elektronu (antioxidantem) spojená se změnou jeho absorpčních vlastností. (podle [16])

K dalším metodám zahrnujícím systém  $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$  patří železito-thiokyanátová metoda (FTCA, *ferric thiocyanate assay*) [14], při níž se spektrofotometricky sleduje přeměna  $\text{Fe}(\text{SCN})_2$  na  $\text{Fe}(\text{SCN})_3$  při vlnové délce 500 nm, a metoda FOX (FOXA, *ferrous oxidation–xylenol orange assay*), stanovující komplex železitého iontu a xylenolové oranžy při vlnové délce 550 nm.

V poslední době se za metodu stanovení antioxidantních vlastností začíná považovat i klasická metoda stanovení celkových fenolických látek podle Folina a Ciocâlțea [6, 15]. Metoda využívá podobně jako předchozí představené redukce činidla – zde komplexních iontů kyseliny fosfowolframové či fosfomolybdenové – a následného spektrofotometrického stanovení při vlnové délce kolem 760 nm. Při stanovení se projeví pouze látky reagující SET mechanismem; pozitivní reakci mohou vykazovat nejen fenolické látky, ale i kyselina askorbová, aromatické aminy a ionty kovů. Jako standard se běžně používá kyselina gallová.

### 1.3.2 Metody založené na komplexnějších reakcích

Řada metod vychází ze složitějších druhů reakcí, leckdy dokonce celých souborů reakcí, jejíž produkty jsou následně stanovovány instrumentálně náročnějšími technikami, např. plynové chromatografie (GC) či hmotnostní spektrometrií (MS).

Velká skupina metod se zabývá stanovením antioxidantních vlastností prostřednictvím inhibice peroxidace lipidů [14]. Peroxidace lipidů je nejčastěji uměle uspíšena přidávkem železnaté či mědné soli a peroxidu vodíku, tj. prostřednictvím Fentonovy reakce, či zvýšením teploty a saturací kyslíkem [30].

Metoda kyseliny thiobarbiturové (TBAA, *thiobarbituric acid assay*) využívá tvorbu kovalentních produktů při reakci kyseliny thiobarbiturové s produkty peroxidace lipidů [14]; tyto adukty vykazují silnou absorpci kolem vlnové délky 535 nm. Sloučeniny sta-

novitelné metodou se nazývají TBARS (*thiobarbituric acid reacting substances*), jedná se především o malondialdehyd (MDA) a další dialdehydy. Malondialdehyd je možné rovněž selektivně stanovit pomocí HPLC, LC/MS nebo po derivatizaci pomocí GC.

Ke stanovení míry inhibice peroxidace je možné také použít metodu odbarvování  $\beta$ -karotenu ( *$\beta$ -carotene bleaching assay*), při níž antioxidant reaguje s lipidperoxylovými radikály v kompetici s přidaným  $\beta$ -karotenem – účinnost antioxidantu je sledována spektrofotomericky při vlnové délce 470 nm (míra úbytku  $\beta$ -karotenu).

Zajímavou metodou, jež se hodí hlavně ke stanovení dlouhodobých inhibičních účinků (řádově dny i delší období) antioxidantů na oxidaci biologického materiálu, je tzv. metoda aldehydu/karboxylové kyseliny (ACAA; *aldehyde/carboxylic acid assay*). Nejčastěji se používá hexanal, po určité době inkubace se stanoví míra jeho konverze na kyselinu hexanovou pomocí GC [2].

## 2 Cíl práce

Mezi hlavní cíle předkládané bakalářské práce patří:

1. Formou literárního přehledu představit problematiku antioxidačních vlastností rostlin včetně hlavních skupin metabolitů zodpovědných za tyto vlastnosti a mechanismů účinku jejich antioxidačního působení.
2. Z vybraných rostlin, zejména rostlin léčivých, infuzně-dekokčním způsobem extrahovat metabolity.
3. U extraktů zjistit různými metodami jejich antioxidační aktivitu a stanovit obsah fenolických látek. Porovnat antioxidační aktivity zkoumaných rostlin mezi sebou a v závislosti na způsobu extrakce a obsahu stanovených látek.

## 3 Materiál a metody

Pokud v textu není uvedeno jinak, je výraz „voda“ významově ekvivalentní výrazu „destilovaná voda“ a „roztok“ je ekvivalentní výrazu „vodný roztok“.

### 3.1 Chemikálie a roztoky

V následujících seznamech jsou uvedeny všechny chemické látky a chemické přípravky, jež byly během experimentů použity. Kde je to vhodné, jsou připojeny i údaje o čistotě použité chemikálie, pokud byla známa, popř. další důležité nebo užitečné informace.

#### 3.1.1 Rozpouštědla

destilovaná voda (100%w, specifická vodivost  $\sim 14 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ , vyrobena na pracovišti)

ethanol 96% Ph. Eur. (96 %v, dle lékopisu [34]; *Lach-Ner*, ČR)

methanol p. a. (100 %w; *Lach-Ner*, ČR)

#### 3.1.2 Čisté látky

2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonát) diamonný (tablety 10 mg; *Sigma-Aldrich*, USA)

*N,N*-di(fenyl)pikrylhydrazyl (*Sigma-Aldrich*, USA)

dusitan draselný p. a. (>98 %w; *Sigma-Aldrich*, USA)

fenol p. a. (>99 %w; *Sigma-Aldrich*, USA)

hydroxid sodný čistý (*Lachema*, ČSSR)

chlorid hlinitý p. a. (>99 %w, bezvodý; *Sigma-Aldrich*, USA)

chlorid železitý, hexahydrát (*Lachema*, ČSSR)

kvercetin, dihydrát (*Sigma-Aldrich*, USA)

kyselina L-askorbová (>99 %w, *SigmaUltra*; *Sigma-Aldrich*, USA)

kyselina 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová (97 %w; také trolox; *Sigma-Aldrich*, USA)

kyselina chlorovodíková p. a. (>35%w, *Lach-Ner*, ČR)

kyselina octová (99,8 %w; *Lach-Ner*, ČR)

peroxodisíran draselný p. a. (>99 %w; *Sigma-Aldrich*, USA)

2,4,6-tripirydyl-*s*-triazin (>98 %w; *Sigma-Aldrich*, USA)

uhlíčitán sodný p. a. (99,8 %w, bezvodý, sušený; *Lachema*, ČSSR)

#### 3.1.3 Činidla a ostatní

činidlo fenolové Folin-Ciocalteu (*Dr. Kulich Pharma*, ČR)

stříkačkové filtry (0,2 a 0,45  $\mu\text{m}$ ; *Schleicher-Schuell*, SRN)

### 3.2 Přístrojové vybavení

analytické váhy ER-120A (*A&D Company*, Japonsko)

laboratorní váhy Kern 440-45 (*Kern*, SRN)

centrifuga UNIVERSAL 32R (*Hettich Zentrifugen*, SRN)

UV/VIS spektrofotometr Ultrospec 1000 (*Pharmacia Biotech*, Švédsko)

elektrický vaříč (*Rohnson – Vassilias International*, Řecko)

pH-metr UltraBasic UB-10 (*Denver Instrument*, USA)

vortex V1-plus (*BioSan*, Litva)

### 3.3 Rostlinný materiál

V souladu s lékopisem [34] je pro souhrnný popis veškerého rostlinného materiálu, tj. jakékoliv části rostliny nebo směsi více částí, s případnými farmakologickými účinky používán pojem droga; to platí i pro rostliny, jež se v lékopisné literatuře běžně nevyskytují, avšak pouze pro účely této práce.

Dále je v rámci předkládané práce přívlastek „usušený“ používán pro vyjádření přítomnosti nejvýše takového množství vody v droze, jež je v rovnováze s okolní vzdušnou vlhkostí; výraz „sušina“ a přívlastky „sušený“, „suchý“ a „vysušený“ jsou pak užívány pro vyjádření přítomnosti žádného nebo stopového množství nevázané vody v rostlinném materiálu.

Rostliny použité v této práci byly pořízeny v obchodních řetězcích nebo pocházejí ze soukromých zdrojů. Seznam všech rostlin včetně dalších specifikací je uveden v tabulce 2 na následující straně. Rostliny v usušeném stavu byly před použitím namlety na hrubý prášek. Výběr rostlin byl víceméně náhodný (s důrazem na léčivé rostliny) v závislosti na aktuální dostupnosti daného materiálu.

U bylin převažují druhy náležející do čeledi hluchavkovitých (*Lamiaceae* LINDL.) a hvězdnicovitých (*Asteraceae* MARTINOV), u zeleniny pak převažují čeledi brukvovitých (*Brassicaceae* BURNETT), hvězdnicovitých (*Asteraceae* MARTINOV), zázvorníkovitých (*Zingiberaceae* LINDL.) a miříkovitých (*Apiaceae* LINDL.) [35].

U zkoumaných rostlin nebyly provedeny žádné zkoušky totožnosti ani zkoušky na lékopisnou kvalitu.



Tabulka 2: Seznam použitých rostlin.

český název (latinský název [35])	část rostliny; stav	původ (doba pořízení)
brukev pekingská, „čínské“ zelí ( <i>Brassica pekinensis</i> RUPR.)	list (prýt); čerstvý	obchod (06/2013)
brukev zelná, brokolice ( <i>B. oleracea</i> var. <i>italica</i> PLENCK)	list (prýt); čerstvý	obchod (04/2013)
brukev zelná, kedluben ( <i>B. oleracea</i> var. <i>gongylodes</i> L.)	list (prýt); čerstvý	obchod (04/2013)
brukev zelná, zelí hlávkové bílé ( <i>B. oleracea</i> convar. <i>capitata</i> var. <i>alba</i> L.)	list (prýt); čerstvý	obchod (04/2013)
cibule kuchyňská ( <i>Allium cepa</i> L.)	cibule; čerstvý	obchod (04/2013)
čajovník čínský ( <i>Camellia sinensis</i> L.)	list „fermentovaný“, usuš.	obchod (11/2011)
dobromysl obecná ( <i>Origanum vulgare</i> L.)	nať; usušený	soukromý (08/2012)
galgán ( <i>Alpinia</i> ROXB.)	oddenek; čerstvý	obchod (06/2013)
hluchavka bílá ( <i>Lamium album</i> L.)	nať; usušený	soukromý (08/2012)
jablečník obecný ( <i>Marrubium vulgare</i> L.)	list; usušený	soukromý (2012)
jitrocel kopinatý ( <i>Plantago lanceolata</i> L.)	nať; usušený	soukromý (08/2012)
kurkumovník dlouhý ( <i>Curcuma longa</i> L.)	oddenek; čerstvý	obchod (06/2013)
levandule lékařská ( <i>Lavandula angustifolia</i> MILL.)	nať; usušený	soukromý (09/2012)
locika setá, salát hlávkový ( <i>Lactuca sativa</i> var. <i>capitata</i> L.)	list (prýt); čerstvý	obchod (06/2013)
locika setá, salát hlávkový ledový ( <i>L. sativa</i> var. <i>capitata</i> L.)	list (prýt); čerstvý	obchod (06/2013)
locika setá, salát listový kadeřavý „Lollo Bionda“ ( <i>L. sativa</i> var. <i>crispa</i> L.)	list (prýt); čerstvý	obchod (06/2013)
locika setá, salát listový kadeřavý „Lollo Rossa“ ( <i>L. sativa</i> var. <i>crispa</i> L.)	list (prýt); čerstvý	obchod (06/2013)
máta peprná ( <i>Mentha x piperita</i> L.)	nať; usušený	soukromý (09/2012)
mateřídouška obecná ( <i>Thymus vulgaris</i> L.)	nať; usušený	soukromý (08/2012)
miřík celer ( <i>Apium graveolens</i> L.)	kořen; čerstvý	obchod (04/2013)
mrkev obecná setá ( <i>Daucus carota</i> subsp. <i>sativus</i> SCHÜBL & G. MARTENS)	kořen; čerstvý	obchod (04/2013)
pampeliška lékařská ( <i>Taraxacum officinale</i> WIGG.)	nať; usušený	soukromý (2012)
routa vonná ( <i>Ruta graveolens</i> L.)	nať; usušený	soukromý (09/2012)
řebříček obecný ( <i>Achillea millefolium</i> L.)	nať; usušený	soukromý (2012)
ředkev setá ( <i>Raphanus sativus</i> L.)	kořen; čerstvý	obchod (04/2013)
řepa obecná, červená ( <i>Beta vulgaris</i> L.)	kořen; čerstvý	obchod (04/2013)
řepík lékařský ( <i>Agrimonia eupatoria</i> L.)	nať; usušený	soukromý (08/2012)
stévie sladká ( <i>Stevia rebaudiana</i> BERTONI)	list; usušený	obchod (2012)
šalvěj lékařská ( <i>Salvia officinalis</i> L.)	nať; usušený	soukromý (09/2012)
špenát setý ( <i>Spinacia oleracea</i> L.)	list; čerstvý	obchod (06/2013)
vlaštovičník větší ( <i>Chelidonium majus</i> L.)	nať; usušený	soukromý (10/2012)
zázvor lékařský ( <i>Zingiber officinale</i> ROSCOE.)	oddenek; čerstvý	obchod (06/2013)

## 3.4 Experimentální metody

Všechny experimenty byly prováděny, pokud v textu není uvedeno jinak, při laboratorní teplotě (cca 21 °C).

### 3.4.1 Extrakce rozpouštědlem

Pro získání metabolitů z neživého rostlinného materiálu byla použita metoda extrakce pomocí vhodného rozpouštědla.

Jako extrakční rozpouštědlo byla vybrána voda a směs 80 %w methanolu a 20 %w vody (dále jen „methanolvý roztok“). Teoreticky spočtený bod varu methanolového roztoku činí za standardních podmínek cca 71 °C.

Do 100mL baňky s kulatým dnem bylo naváženo přesně přibližně 2,5 g drogy. K rostlinnému materiálu bylo přidáno 50 mL extrakčního rozpouštědla a směs byla neprodleně po dobu 30 min zahřívána ve vodní lázni pod zpětným chladičem. Teplota vodní lázně během zahřívání byla pasivně udržována v rozmezí  $(80 \pm 2)$  °C při použití vody a  $(70 \pm 2)$  °C při použití methanolového roztoku.

Směs se ponechala přibližně 5 min vychladnout a poté byla filtrována od větších rostlinných zbytků přes čtyři vrstvy gázy. Následně byl filtrát centrifugován po dobu 10 min při zrychlení 9400g a teplotě 4 °C. Supernatant byl filtrován pomocí stříkačkového filtru o velikosti pórů 0,2 µm; pokud během filtrace, zvláště u některých vodných extraktů, došlo k rychlému a nevratnému zanesení použitého filtru, byl pro filtraci použit filtr o velikosti pórů 0,45 µm.

Takto připravený extrakt byl skladován pro další použití v uzavřených lahvičkách v mrazničce při teplotě –28 °C nebo nižší.

### 3.4.2 Extrakce šťáv

V případě živého rostlinného materiálu bylo k získání extraktu (rostlinné šťávy) použito odšťavňovacího zařízení.

Zvážený rostlinný materiál byl vhodně nakrájen a následně odšťavněn. Získaná šťáva byla filtrována od větších rostlinných zbytků přes čtyři vrstvy gázy a byl změřen její objem; filtrát byl následně centrifugován po dobu 10 min při zrychlení 9400g a teplotě 4 °C. Supernatant byl poté filtrován pomocí stříkačkového filtru o velikosti pórů 0,45 µm.

Připravené extrakty (šťávy) byly skladovány pro další použití v uzavřených lahvičkách v mrazničce při teplotě –28 °C nebo nižší.

### 3.4.3 Stanovení ztráty sušením rostlinného materiálu

Metoda byla s malými úpravami převzata z lékopisu [34]. Do předem zvážené Petriho misky byl rychle navážen přesně přibližně 0,5 g rostlinného materiálu. Vzorek byl zahříván na vařiči při teplotě  $(100 \pm 5) ^\circ\text{C}$  minimálně po dobu 45 min. Petriho miska s vysušeným vzorkem byla před zvážením ponechána v exsikátoru.

K výpočtu obsahu těkavých látek, a to především vody, v rostlinném materiálu byla použita rovnice 3.1,

$$w_{\text{TL}} = \left[ 1 - \frac{m(\text{f})}{m(\text{i})} \right] 100 \% \quad (3.1)$$

kde  $w_{\text{TL}}$  ... hmotnostní procento těkavých látek a vody v rostlinném materiálu,  $[w_{\text{TL}}] = \%$ ;  $m$  ... hmotnost rostlinného materiálu,  $[m] = \text{g}$ ; i ... počátek zahřívání; f ... konec zahřívání.

### 3.4.4 Stanovení zbytku po vysušení extraktu

Metoda byla převzata z lékopisu [34] a upravena. Do předem zvážené Petriho misky bylo rychle naváženo přesně asi 2,0 g extraktu a tento byl poté zahříván na vařiči při teplotě  $(100 \pm 5) ^\circ\text{C}$  minimálně po dobu 20 min nebo až do úplného odpaření těkavých látek. Petriho miska byla potom ponechána minimálně 30 min v exsikátoru a následně byla zvážena.

Odparky byly po zvážení skladovány pro další použití v uzavřených mikrozku mávkách v mrazničce při teplotě  $-28 ^\circ\text{C}$  nebo nižší.

K výpočtu obsahu netěkavých látek v extraktu byla použita rovnice 3.2,

$$w_{\text{NL}} = \frac{m(\text{f})}{m(\text{i})} 100 \% \quad (3.2)$$

kde  $w_{\text{NL}}$  ... hmotnostní zlomek netěkavých látek v extraktu,  $[w_{\text{NL}}] = \%$ ;  $m$  ... hmotnost extraktu,  $[m] = \text{g}$ ; i ... počátek odpařování; f ... konec odpařování.

K výpočtu obsahu extrahovatelných netěkavých látek v sušině drogy byla použita rovnice 3.3,

$$w_{\text{ENL}} = \frac{w_{\text{NL}}}{(1 - w_{\text{TL}})} \frac{\rho V}{m} \quad (3.3)$$

kde  $w_{\text{ENL}}$  ... hmotnostní zlomek extrahovatelných netěkavých látek v sušené droze,  $[w_{\text{ENL}}] = \%$ ;  $\rho$  ... hustota rozpouštědla,  $[\rho] = \text{g.L}^{-1}$ ;  $V$  ... objem rozpouštědla,  $[V] = \text{L}$ ;  $m$  ... hmotnost rostlinného materiálu,  $[m] = \text{g}$ ;  $\rho(80\% \text{w MeOH}) = 843 \text{ g.L}^{-1}$  (hustota 80%w roztoku methanolu byla stanovena při teplotě  $21 ^\circ\text{C}$ ).

V rovnici 3.3 je užito zjednodušujícího zanedbání vlastní hustoty extraktu – její

hodnota je nahrazena hustotou rozpouštědla.

### 3.4.5 Stanovení obsahu fenolických látek

Metoda – stanovení celkových fenolů podle Folina a Ciocâlțea – byla přejata z literatury [36, 37] a drobně modifikována. Celý postup shrnuje tabulka 3. Do zkumavky bylo pipetováno 200  $\mu\text{L}$  vzorku – rostlinného extraktu předem vhodně ředěného vodou – a 1000  $\mu\text{L}$  10%v fenolového činidla (Folinova činidla) a po dvou minutách 800  $\mu\text{L}$  75g.L<sup>-1</sup> roztoku uhličitanu sodného ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), načež byla reakční směs promíchána.

Po 28 min inkubace takto připravené směsi byla na spektrofotometru změřena její absorbance při vlnové délce 760 nm a tloušťce kyvety 10,0 mm proti roztoku slepého vzorku, v němž byl zředěný rostlinný extrakt nahrazen destilovanou vodou.

Tabulka 3: Postup přípravy roztoku pro stanovení fenolických látek.

složka	objem	pořadí	čas přidání
ředěný extrakt <sup>1)</sup>	200 $\mu\text{L}$	1	0 min
10%v Folinovo činidlo	1000 $\mu\text{L}$	2	0 min
75g.L <sup>-1</sup> $\text{Na}_2\text{CO}_3$	800 $\mu\text{L}$	3	2 min

čas měření: 30 min; vlnová délka 760 nm

<sup>1)</sup> v případě slepého vzorku destilovaná voda

Kalibrace metody byla provedena nahrazením ředěného rostlinného extraktu roztokem fenolu, a to v koncentračním rozsahu 200–850  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ . Poté byla provedena lineární regresní analýza experimentálně získaných dat, na jejímž základě byla vytvořena kalibrační závislost absorbance při vlnové délce 760 nm na molární koncentraci fenolu neboli koncentraci molekvivalentů fenolu v ředěném vzorku; z této závislosti byla odvozena rovnice 3.4,

$$c_{\text{PL}}^{\text{ex}} = f_{\text{dil}} \frac{A_{760} - k_2}{k_1}, \quad (3.4)$$

kde  $c_{\text{PL}}^{\text{ex}}$  ... molární koncentrace fenolu, resp. molekvivalentů fenolu, v extraktu,  $[c_{\text{PL}}^{\text{ex}}] = \text{molEF.L}^{-1}$ ;  $A_{760}$  ... absorbance při vlnové délce 760 nm;  $f_{\text{dil}}$  ... faktor ředění extraktu;  $k_1, k_2$  ... regresní konstanty,  $k_1 = (1089 \pm 14) \text{ L.molEF}^{-1}$ ,  $k_2 = (0,052 \pm 0,008)$ .

### 3.4.6 Stanovení obsahu flavonoidů

Metoda vychází z novější úpravy [38] původního stanovení dle Dowda [27]. Postup stanovení shrnuje tabulka 4 na následující straně. Do zkumavky bylo pipetováno 200  $\mu\text{L}$  rost-

linného extraktu předem vhodně naředěného vodou, 1,50 mL vody a 75  $\mu\text{L}$  50g.L<sup>-1</sup> roztoku dusitanu draselného (KNO<sub>2</sub>). Po pěti minutách bylo dále přidáno 150  $\mu\text{L}$  100g.L<sup>-1</sup> roztoku chloridu hlinitého (AlCl<sub>3</sub>) a po dalších pěti minutách nakonec 500  $\mu\text{L}$  1mol.L<sup>-1</sup> roztoku hydroxidu sodného (NaOH); směs byla po každém přidavku činidla promíchána.

Po dvou minutách inkubace připravené směsi byla pomocí spektrofotometru změněna její absorbance při vlnové délce 510 nm a tloušťce kyvety 10,0 mm proti roztoku slepého vzorku, v němž byl roztok chloridu hlinitého nahrazen destilovanou vodou.

Tabulka 4: Postup přípravy roztoku pro stanovení flavonoidů.

složka	objem	pořadí	čas přidání
ředěný extrakt	200 $\mu\text{L}$	1	0 min
voda	1,50 mL	2	0 min
50g.L <sup>-1</sup> KNO <sub>2</sub>	75 $\mu\text{L}$	3	0 min
100g.L <sup>-1</sup> AlCl <sub>3</sub> <sup>1)</sup>	150 $\mu\text{L}$	4	5 min
1M NaOH	500 $\mu\text{L}$	5	10 min

čas měření: 12 min; vlnová délka 510 nm

<sup>1)</sup> v případě slepého vzorku destilovaná voda

Kalibrace metody byla provedena nahrazením ředěného rostlinného extraktu 50%v ethanolovým roztokem kvercetinu, a to v koncentračním rozsahu 100–900  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ . Pro tento účel byla provedena lineární regresní analýza experimentálně získaných hodnot, na jejímž základě byla sestavena kalibrační závislost absorbance při vlnové délce 510 nm na molární koncentraci kvercetinu neboli koncentraci molekvivalentů kvercetinu v neředěném vzorku; z této závislosti prostým odvozením plyne rovnice 3.5,

$$c_{\text{FL}}^{\text{ex}} = f_{\text{dil}} \frac{A_{510} - k_2}{k_1} \quad (3.5)$$

kde  $c_{\text{FL}}^{\text{ex}}$  ... molární koncentrace kvercetinu, resp. molekvivalentů kvercetinu, v extraktu,  $[c_{\text{FL}}^{\text{ex}}] = \text{molEK.L}^{-1}$ ;  $A_{510}$  ... absorbance při vlnové délce 510 nm;  $f_{\text{dil}}$  ... faktor ředění extraktu;  $k_1$ ,  $k_2$  ... regresní konstanty,  $k_1 = (255,1 \pm 7,1) \text{ L.molEK}^{-1}$ ,  $k_2 = (0,0095 \pm 0,0040)$ .

### 3.4.7 Stanovení antioxidačních vlastností metodou DPPH

Metoda byla s úpravami převzata z literatury [30, 39]. Postup stanovení shrnuje tabulka 5 na následující straně. Do zkumavky bylo pipetováno 1000  $\mu\text{L}$  96%v ethanolu, 500  $\mu\text{L}$  rostlinného extraktu předem vhodně naředěného vodou a 500  $\mu\text{L}$  cca 400 $\mu\text{mol.L}^{-1}$

ethanolového roztoku DPPH připraveného před měřením; směs byla promíchána. Paralelně bylo do referentní zkumavky místo zředěného rostlinného extraktu pipetováno 500  $\mu\text{L}$  destilované vody.

Po 10 minutách inkubace takto připraveného měrného a referentního roztoku byla neprodleně pomocí spektrofotometru změřena jejich absorbance při vlnové délce 517 nm a tloušťce kyvety 10,0 mm proti roztoku slepého vzorku, v němž byl zředěný rostlinný extrakt nahrazen destilovanou vodou a roztok DPPH pak 96%v ethanolu.

Od hodnoty absorbance měrného roztoku byla odečtena absorbance referentního roztoku a byl tak získán úbytek absorbance za dobu 10 min.

Tabulka 5: Postup přípravy roztoku pro stanovení antioxidačních vlastností s DPPH.

složka	objem	pořadí	čas přidání
96%v ethanol	1000 $\mu\text{L}$	1	0 min
ředěný extrakt <sup>1)</sup>	500 $\mu\text{L}$	2	0 min
$\sim 400 \mu\text{mol.L}^{-1}$ DPPH • <sup>2)</sup>	500 $\mu\text{L}$	3	0 min

čas měření: 10 min; vlnová délka 517 nm

<sup>1)</sup> v případě slepého vzorku a reference destilovaná voda

<sup>2)</sup> v případě slepého vzorku 96%v ethanol

Kalibrace metody byla provedena nahrazením ředěného rostlinného extraktu 50%v ethanolovým roztokem troloxu, a to v koncentračním rozsahu 20–150  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ . Byla provedena lineární regresní analýza experimentálních hodnot, na jejímž základě byla sestavena kalibrační závislost záporného úbytku molární koncentrace DPPH na molární koncentraci troloxu neboli koncentraci molekvivalentů troloxu v ředěném extraktu. Pro výpočet koncentrace molekvivalentů troloxu v neředěném vzorku byla použita rovnice 3.6,

$$c_{\text{ET}}^{\text{ex}} = -f_{\text{dil}} \frac{\Delta A_{517} + k_2}{k_1} \quad (3.6)$$

kde  $c_{\text{ET}}^{\text{ex}}$  ... molární koncentrace troloxu, resp. molekvivalentů troloxu, v extraktu,  $[c_{\text{ET}}^{\text{ex}}] = \text{mol ET.L}^{-1}$ ;  $\Delta A_{517}$  ... úbytek absorbance při vlnové délce 517 nm;  $f_{\text{dil}}$  ... faktor ředění extraktu;  $k_1$ ,  $k_2$  ... regresní konstanty,  $k_1 = (6648 \pm 121) \text{ L.mol ET}^{-1}$ ,  $k_2 = -(0,0396 \pm 0,0113)$ .

### 3.4.8 Stanovení antioxidačních vlastností metodou ABTS

Metoda vychází z literatury [39, 40]. Roztok činidla byl připraven následovně: Tableta obsahující 10,0 mg amonné soli ABTS a nejvýše 2,46 mg peroxodisíranu draselného

byly rozpuštěny v 3000  $\mu\text{L}$  vody a po minimálně 16hodinové inkubaci v temnu byl roztok zředěn rovněž vodou cca 55krát (přibližně na absorbanci 1,30 při vlnové délce 734 nm).

Postup stanovení shrnuje tabulka 6. Do zkumavky bylo pipetováno 200  $\mu\text{L}$  rostlinného extraktu vhodně ředěného vodou a 1000  $\mu\text{L}$  cca  $110\mu\text{mol.L}^{-1}$  roztoku kationradikálu ABTS. Dále bylo do referentní zkumavky místo zředěného rostlinného extraktu pipetováno 200  $\mu\text{L}$  destilované vody.

U reakční směsi byla po 10min inkubaci změřena na spektrofotometru absorbance při vlnové délce 734 nm a tloušťce kyvety 10,0 mm proti roztoku slepého vzorku, ve kterém byly zředěný rostlinný extrakt a roztok  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  nahrazeny vodou.

Tabulka 6: Postup přípravy roztoku pro stanovení s ABTS.

složka	objem	pořadí	čas přidání
ředěný extrakt <sup>1)</sup>	200 $\mu\text{L}$	1	0 min
$\sim 110\mu\text{mol.L}^{-1}$ ABTS $^{\bullet+}$ <sup>2)</sup>	1000 $\mu\text{L}$	2	0 min

čas měření: 10 min; vlnová délka 734 nm

<sup>1)</sup> v případě slepého a referentního vzorku destilovaná voda

<sup>2)</sup> v případě slepého vzorku destilovaná voda

Hodnota absorbance referentního roztoku byla následně odečtena od absorbance měrného roztoku a tímto byla získána hodnota úbytku absorbance za daný časový úsek.

Metoda byla kalibrována nahrazením ředěného rostlinného extraktu 50%v ethanolvým roztokem troloxu v koncentračním rozsahu 20–250  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ . Z výstupu regresní analýzy experimentálně získaných bodů byla získána kalibrační závislost záporného úbytku absorbance při vlnové délce 734 nm na molární koncentraci troloxu / koncentraci molekvivalentů troloxu v ředěném vzorku; z nalezené závislosti pak vychází rovnice 3.7,

$$c_{\text{ET}}^{\text{ex}} = -f_{\text{dil}} \frac{\Delta A_{734} + k_2}{k_1} \quad (3.7)$$

kde  $c_{\text{ET}}^{\text{ex}}$  ... molární koncentrace troloxu, resp. molekvivalentů troloxu, v extraktu,  $[c_{\text{ET}}^{\text{ex}}] = \text{molET.L}^{-1}$ ;  $\Delta A_{734}$  ... úbytek absorbance při vlnové délce 734 nm;  $f_{\text{dil}}$  ... faktor ředění extraktu;  $k_1, k_2$  ... regresní konstanty,  $k_1 = (4250 \pm 76) \text{ L.molET}^{-1}$ ,  $k_2 = (0,0145 \pm \pm 0,0109)$ .

### 3.4.9 Stanovení antioxidačních vlastností metodou FRAP

Metoda byla přejata z literatury [37, 41] a lehce upravena. Postup stanovení shrnuje tabulka 7. Do zkumavky bylo pipetováno 200  $\mu\text{L}$  rostlinného extraktu vhodně ředěného vodou a 1000  $\mu\text{L}$  FRAP činidla skládajícího se z 25 %v cca 700  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  roztoku TPTZ v 40  $\text{mmol.L}^{-1}$  kyselině chlorovodíkové, 10 %v 20  $\text{mmol.L}^{-1}$  roztoku chloridu železitého a z 65 %v 300  $\text{mmol.L}^{-1}$  octanového pufru o pH 3,6. Směs byla po přidavku činidla promíchána.

Tabulka 7: Postup přípravy roztoku pro stanovení FRAP.

složka	objem	pořadí	čas přidání
ředěný extrakt <sup>1)</sup>	200 $\mu\text{L}$	1	0 min
FRAP činidlo	1000 $\mu\text{L}$	2	0 min

čas měření: 10 min; vlnová délka 593 nm

<sup>1)</sup> v případě slepého vzorku destilovaná voda

Po 10 minutách inkubace připravené reakční směsi byla na spektrofotometru změněna její absorbance při vlnové délce 593 nm a tloušťce kyvety 10,0 mm proti roztoku slepého vzorku, v němž byl ředěný rostlinný extrakt nahrazen destilovanou vodou.

Kalibrace metody byla provedena nahrazením ředěného rostlinného extraktu roztokem kyseliny askorbové, a to v koncentračním rozsahu 25–125  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ . Podle výsledků regresní analýzy experimentálně získaných dat byla sestavena kalibrační závislost absorbance při vlnové délce 593 nm na molární koncentraci askorbátu neboli koncentraci molekvivalentů askorbátu v neředěném vzorku, pomocí níž byla vytvořena rovnice 3.8,

$$c_{\text{EA}}^{\text{ex}} = f_{\text{dil}} \frac{A_{593} + k_2}{k_1} \quad (3.8)$$

kde  $c_{\text{EA}}^{\text{ex}}$  ... molární koncentrace askorbátu, resp. molekvivalentů askorbátu, v extraktu,  $[c_{\text{EA}}^{\text{ex}}] = \text{molEA.L}^{-1}$ ;  $A_{593}$  ... absorbance při vlnové délce 593 nm;  $f_{\text{dil}}$  ... faktor ředění extraktu;  $k_1, k_2$  ... regresní konstanty,  $k_1 = (7724 \pm 179) \text{ L.molEA}^{-1}$ ,  $k_2 = -(0,036 \pm 0,014)$ .

### 3.4.10 Výpočet molárního zastoupení

Uměle vytvořená veličina „molární zastoupení“  $z$  mající význam molu ekvivalentů (nebo také „molekvivalentu“) dané standardní látky X v hmotnostní jednotce rostlinné sušiny, přednostně pak  $[z] = \text{molEX.kg}^{-1}$ , byla použita k jednotnému vyhodnocení metod stanovení představených v odstavcích 3.4.5 až 3.4.9.

Pro výpočet molárního zastoupení byla vytvořena obecná rovnice 3.9 na následující straně,



$$z = \frac{c_{\text{EX}}^{\text{ex}} V}{(1 - w_{\text{TL}})m} \quad (3.9)$$

kde  $z$  ... zastoupení molekvivalentů daného kalibračního standardu v suché droze;  $c_{\text{EX}}^{\text{ex}}$  ... koncentrace molekvivalentů standardu v extraktu,  $[c_{\text{EX}}^{\text{ex}}] = \text{molEX.L}^{-1}$ ;  $V$  ... objem rozpouštědla,  $[V] = \text{mL}$ ;  $w_{\text{TL}}$  ... hmotnostní zlomek těkavých látek a vody v usušené droze,  $[w_{\text{TL}}] = 0$ ;  $m$  ... hmotnost rostlinného materiálu,  $[m] = \text{g}$ .

Pro konkrétní metody se pak jednalo o molární zastoupení fenolických látek  $z_{\text{PL}}$  vztažených na fenol (odstavec 3.4.5 na straně 36), molární zastoupení flavonoidů  $z_{\text{FL}}$  vztažených na kvercetin (odstavec 3.4.6 na straně 36), zastoupení molekvivalentů troloxu  $z_{\text{DPPH}}$  a  $z_{\text{ABTS}}$  (odstavce 3.4.7 na straně 37 a 3.4.8 na straně 38) a zastoupení molekvivalentů kyseliny askorbové/askorbátu  $z_{\text{FRAP}}$  (odstavec 3.4.9 na předchozí straně).

### 3.5 Statistické vyhodnocení a regresní analýza

Jednotlivá stanovení byla provedena, pokud tomu nic nebránilo, většinou čtyřikrát. Při mezivýpočtech podle rovnic uvedených v předchozích odstavcích byl použit medián daného experimentálního souboru veličiny  $x$  bez směrodatných odchylek. Směrodatnými odchylkami byly opatřeny až konečné výsledky uváděné v následující kapitole.

Použité statistické metody byly převzaty z literatury [42]. Ze získaných souborů  $n$  hodnot byly nejprve podle Deanova-Dixonova testu vyloučeny odlehlé hodnoty, a to tak, že bylo pro minimální a maximální hodnotu souboru vypočteno kritérium  $Q_{\min}$  a  $Q_{\max}$  (vztahy 3.10, 3.11 a 3.12 na následující straně) a toto následně bylo porovnáno s kritickou hodnotou kritéria  $Q_k$  (v tabulce 8), tj. pokud  $\{Q_{\min}; Q_{\max}\} > Q_k$ , byla daná krajní hodnota vyloučena. Odlehlé hodnoty byly počítány jen pro soubory o třech a více hodnotách a pouze jednou.

Tabulka 8: Hodnoty tabelovaných koeficientů pro statistické hodnocení výsledků na hladině významnosti 0,05 ( $\alpha = 0,05$ ) [42].

$n$	$Q_k$	$k_I$	$k_o$
2	—	6,40	0,886
3	0,941	1,30	0,951
4	0,765	0,72	0,486

$$Q_{\min} = \frac{x_{\min+1} - x_{\min}}{R} \quad (3.10)$$

$$Q_{\max} = \frac{x_{\max} - x_{\max-1}}{R} \quad (3.11)$$

$$R = x_{\max} - x_{\min} \quad (3.12)$$

$Q$  ... kritérium;  $x$  ... hodnota dané veličiny;  $R$  ... rozpětí;  $\min$  ... nejnižší (hodnota);  $(\min + 1)$  ... druhá nejnižší;  $\max$  ... nejvyšší;  $(\max - 1)$  ... druhá nejvyšší.

Interval spolehlivosti byl vypočten podle vztahu 3.13,

$$I = k_I R \quad (3.13)$$

kde  $I$  ... interval spolehlivosti;  $k_I$  ... tabelovaný koeficient (tab. 8 na předchozí straně);  $R$  ... rozpětí.

Relativní směrodatná odchylka byla spočtena podle vztahu 3.14,

$$o_r = \frac{k_o R}{\tilde{x}} 100 \% \quad (3.14)$$

kde  $o_r$  ... relativní směrodatná odchylka;  $k_o$  ... tabelovaný koeficient (tab. 8 na předchozí straně);  $R$  ... rozpětí;  $\tilde{x}$  ... medián.

Výsledky jsou uváděny ve tvaru

**MEDIÁN  $\pm$  INTERVAL** a eventuálně **ODCHYLKA**,

tj.  $\tilde{x} \pm I$  ( $o_r = y \%$ ); v grafech pak obousměrné chybové úsečky značí právě interval spolehlivosti.

K vyhodnocení dalších experimentálních závislostí byly použity programy *gnuplot* a *MS Excel*, jenž pracují ve výchozím módu při vytváření regresního vztahu s metodou nejmenších čtverců.

Pearsonovy korelační koeficienty jsou opatřeny pravděpodobnostními  $P$ -hodnotami vypočtenými s pomocí Studentova  $t$ -testu na hladině významnosti 0,05 ( $\alpha = 0,05$ ).  $t$ -hodnota byla vypočtena podle rovnice 3.15 [43],

$$t = R \frac{\sqrt{N-2}}{\sqrt{1-R^2}} \quad (3.15)$$

kde  $t$  ...  $t$ -hodnota Studentova testu;  $R$  ... korelační koeficient;  $N$  ... počet párů hodnot v souboru.

## 4 Výsledky

Všech 15 druhů bylin použitých v usušené formě bylo podrobeno extrakci horkou vodou či methanolovým roztokem, šťáva ze 17 druhů / odrůd zeleniny v čerstvé formě byla naopak extrahována prostým odšťavněním. Zbytky po odšťavnění zázvoru, kurkumovníku a galgánu byly navíc ještě extrahovány horkým methanolovým roztokem. Celkem takto bylo získáno 50 rostlinných extraktů (30 „bylinných“ a 20 „zeleninových“), jež vytvářejí výchozí soubor pro další stanovení.

### 4.1 Výsledky gravimetrických stanovení

Následující analýzy byly provedeny hlavně za účelem standardizace výsledků získaných použitím rostlinného materiálu různé povahy (čerstvé i usušené části rostlin) a také za účelem zhodnocení výtěžnosti extrakčního procesu.

Výsledky stanovení ztráty sušením rostlinného materiálu (ad odstavec 3.4.3) jsou uvedeny v tabulce 10 na straně 45 pro extrakty získané pomocí methanolového roztoku či vody (ad 3.4.1) a v tabulce 9 na následující straně pro extrakty získané odšťavněním (metoda 3.4.2); jsou vyjádřeny formou hmotnostních procent ( $w_{TL}$  – hmotnostní zlomek vody a těkavých látek ve výchozím rostlinném materiálu) a značí obsah vody a dalších těkavých látek, jež se sušením při cca 100 °C z rostlinného materiálu uvolnily.

Jak je z tab. 10 patrné, pro již usušený rostlinný materiál (vizte pozn. na straně 32) – vesměs bylinné drogy – byl zjištěn obsah těkavých látek přibližně v rozmezí 4,4–7,4 %w s průměrem 5,8 %w. Zde je třeba podotknout, že galgán, kurkumovník a zázvor zde uvedené byly extrahovány v podobě zbytků po procesu odšťavněnění, a to pouze methanolovým roztokem; z toho důvodu se hodnoty pohybují ve vyšším rozmezí 81–85 %w (průměr 83 %w).

Výsledky v tab. 9 ukazují na vyšší obsah vody a těkavých látek v čerstvém rostlinném materiálu, a to v rozmezí 78–97 %w s průměrem 89 %w. Nejvyšší hodnoty byly nalezena u ředkve a salátů, nejnižší pak u galgánu, zázvoru a řepy.

Výsledky stanovení zbytku po odpaření extraktu (odstavec 3.4.4) jsou analogicky uvedeny v tabulce 10 na straně 45 a 9 na následující straně pro extrakty a pro šťávy. Hodnoty jsou rovněž vyjádřeny formou hmotnostních procent ( $w_{NL}$  – hmotnostní zlomek netěkavých látek v extraktu) a znamenají obsah látek, jež se při 100 °C z extraktu neodpařily a mohou být v rámci této metody považovány za netěkavé. Lze tedy říci, že čím vyšší je hodnota  $w_{NL}$ , tím více netěkavých látek se extrahovalo.

Z tab. 10 vyplývá, že pro methanolové i vodné extrakty se hodnoty pohybují v rozmezí 0,85–2,2 %w (průměr 1,5 %w), přičemž vodné extrakty vykazují průměrně

o cca 7 % vyšší obsah netěkavých látek než extrakty methanолоvé. Nejvyšší hodnoty obsahu netěkavých složek byly nalezeny u vodných extraktů vlašovičnicku, routy a řepíku a v případě methanолоvých extraktů pak u stévie, čajovníku a rovněž u řepíku. Vodný i methanолоvý extrakt levandule naopak obsahují nejméně netěkavých látek.

Methanолоvé extrakty zázvoru, galgánu a kurkumovníku nejsou s ostatními výsledky porovnatelné, jelikož se při extrakci vycházelo z jiných navážek (řádově 4krát vyšších).

Naproti tomu u zeleninových šťáv (tab. 9) se hodnoty  $w_{NL}$  pohybují ve vyšších mezích 2,1–12 %w (průměr 4,9 %w), přičemž nejvíce netěkavých látek obsahuje šťáva z řepy a nejméně potom šťáva získaná z ledového salátu.

Tabulka 9: Výsledky gravimetrických stanovení pro rostlinné šťávy.

název	$w_{TL}$ (%w)	$o_r$	$w_{NL}$ (%w)	$o_r$	$w_{ENL}$ (%w)	$o_r$
brokolice	$87,3 \pm 2,5$	1 %	$5,9 \pm 0,1$	1 %	$4,6 \pm 0,1$	1 %
celer	$88,6 \pm 0,1$	0 %	6,7	0 %	7,2	0 %
cibule	$88,2 \pm 2,8$	2 %	$7,6 \pm 0,2$	1 %	12	1 %
galgán	$92,3 \pm 0,7$	1 %	2,7	0 %	11	0 %
kedluben	$91,0 \pm 0,3$	0 %	$5,5 \pm 0,1$	2 %	13	2 %
kurkumovník	$78,5 \pm 0,7$	1 %	4,3	0 %	5,2	0 %
mrkev	$88,5 \pm 0,7$	1 %	$7,4 \pm 0,1$	1 %	12	1 %
ředkev	$96,9 \pm 0,1$	0 %	$2,5 \pm 0,1$	3 %	$19 \pm 1$	3 %
řepa	$82,9 \pm 1,1$	1 %	12	1 %	$7,8 \pm 0,1$	1 %
salát hlávkový	$92,0 \pm 0,5$	0 %	4,3	1 %	14	1 %
salát ledový	$94,9 \pm 0,9$	1 %	2,1	1 %	$6,0 \pm 0,1$	1 %
salát „Lollo Bionda“	$94,4 \pm 1,3$	1 %	2,2	0 %	6,1	0 %
salát „Lollo Rossa“	$94,4 \pm 0,5$	0 %	3,4	0 %	$9,7 \pm 0,1$	0 %
špenát	$93,7 \pm 1,1$	1 %	$3,0 \pm 0,1$	3 %	$18 \pm 1$	3 %
zázvor	$80,8 \pm 6,6$	6 %	$3,4 \pm 0,1$	1 %	$6,3 \pm 0,1$	1 %
zelí „čínské“	$93,6 \pm 0,7$	1 %	$3,5 \pm 0,1$	2 %	$9,4 \pm 0,2$	2 %
zelí bílé	$88,3 \pm 1,0$	1 %	$7,4 \pm 0,1$	1 %	11	1 %

Pro vyjádření množství netěkavých látek, jež jsou za daných podmínek z rostlinného materiálu extrahovatelné, byla použita veličina  $w_{ENL}$  – hmotnostní zlomek extrahovatelných netěkavých látek v sušině. Výsledky jsou uvedeny rovněž v tabulce 10 na následující straně pro bylinné extrakty a v tabulce 9 pro šťávy.

V sušině bylin se nachází mezi 14–38 %w látek extrahovatelných methanолоvým roztokem (průměr činí 25 %w) a 18–47 %w netěkavých látek extrahovatelných vodou (s průměrem 33 %w). Nejméně těchto látek lze získat extrakcí z levandule (oběma způsoby), zázvoru a kurkumovníku, největší obsah extrahovatelných látek pak vykazují vlašovičnick (meth. i vod.), stévie (meth. i vod.), řepík (vod.), routa (vod.), hluchavka (vod.), galgán (meth.) a např. čajovník (meth.).

Tabulka 10: Výsledky gravimetrických stanovení pro extrakty (vodné a methanolové).

název	$w_{TL}$ (%w)			$w_{NL}$ (%w)			$w_{ENL}$ (%w)		
	$w_{TL}$	$\alpha_r$	MeOH	$w_{NL}$	$\alpha_r$	H <sub>2</sub> O	MeOH	$\alpha_r$	H <sub>2</sub> O
čajovník	$6,5 \pm 0,3$	3 %	1,8	1 %	3 %	$1,3 \pm 0,1$	$33 \pm 1$	1 %	$27 \pm 1$
dobromysl	$7,1 \pm 0,2$	1 %	1,1	2 %	1 %	1,6	20	2 %	$35 \pm 1$
galgán	$84,1 \pm 1,7$	1 %	$1,3 \pm 0,1$	5 %	—	—	$33 \pm 2$	5 %	—
hluchavka	$4,4 \pm 0,9$	13 %	1,6	0 %	1 %	1,8	28	0 %	$38 \pm 1$
jablečník	$5,3 \pm 0,3$	3 %	1,0	2 %	1 %	1,3	$22 \pm 1$	2 %	34
jítrocel	$5,0 \pm 0,3$	5 %	1,6	0 %	2 %	1,8	28	0 %	$37 \pm 1$
kurkumovník	$80,5 \pm 0,3$	0 %	$0,63 \pm 0,04$	4 %	—	—	$15 \pm 1$	4 %	—
levandule	$5,9 \pm 0,4$	5 %	0,96	1 %	0 %	0,86	17	1 %	18
máta	$7,1 \pm 0,6$	6 %	1,3	2 %	1 %	1,6	$24 \pm 1$	2 %	$35 \pm 1$
materídouška	$6,0 \pm 0,8$	10 %	1,1	1 %	2 %	1,1	20	1 %	$23 \pm 1$
pampeliška	$5,8 \pm 1,0$	12 %	1,3	2 %	0 %	1,6	$23 \pm 1$	2 %	33
routa	$5,7 \pm 0,5$	6 %	1,4	1 %	1 %	1,9	24	1 %	41
řebříček	$5,2 \pm 1,1$	14 %	1,2	2 %	3 %	1,2	$21 \pm 1$	2 %	$25 \pm 1$
řepík	$5,3 \pm 0,7$	9 %	1,7	1 %	—	1,9	31	1 %	39
stévie	$4,6 \pm 0,7$	10 %	$2,2 \pm 0,3$	5 %	0 %	1,8	$38 \pm 4$	5 %	38
šalvěj	$5,8 \pm 0,1$	1 %	1,1	2 %	1 %	1,2	$19 \pm 1$	2 %	$26 \pm 1$
vlastovičník	$7,4 \pm 0,1$	1 %	$1,6 \pm 0,1$	7 %	5 %	$2,2 \pm 0,2$	$36 \pm 3$	7 %	$47 \pm 5$
závor	$85,5 \pm 0,6$	1 %	$0,49 \pm 0,05$	6 %	—	—	$14 \pm 1$	6 %	—

Celkově tyto rostliny obsahují průměrně o 8 %w více látek extrahovatelných horkou vodou než látek extrahovatelných methanolem.

V tab. 9 na straně 44 se hodnoty nalezené u rostlinných šťáv pohybují v rozmezí 4,6–19 %w (průměr 10 %w), přitom nejvyšší hodnota extrahovatelných látek byla zjištěna u ředkve a špenátu, nejnižší naopak u brokolice, ledového salátu nebo kurkumovníku.

## 4.2 Výsledky skupinových stanovení

Následující výsledky se týkají stanovení fenolických látek (metoda 3.4.5 na straně 36) a stanovení flavonoidů (metoda 3.4.6 na straně 36).

Na obrázku 4.1 na straně 48 jsou uvedeny hodnoty molárního zastoupení ekvivalentů fenolu v sušině rostlinného materiálu pro vodné a methanole extrakty (horní část) a pro šťávy (dolní část).

Při extrakci methanolem vykazují byliny zastoupení mezi 142–1040 mmolEF.kg<sup>-1</sup> (13,3–98,1 mg fenolu.kg<sup>-1</sup>) s průměrnou hodnotou 429 mmolEF.kg<sup>-1</sup> (40,4 mg fenolu.g<sup>-1</sup>); nejvyšší obsah extrahovatelný methanolem byl nalezen u extraktů čajovníku, kurkumovníku, řepíku, máty, stévie a dobromysli, nejnižší pak u galgánu, zázvoru, hluchavky a levandule. Po extrakci vodou vykazují dané rostliny obsah přibližně 182–804 mmolEF.kg<sup>-1</sup> (17,1–75,6 mg fenolu.g<sup>-1</sup>), přičemž průměr činí 457 mmolEF.kg<sup>-1</sup> (43,0 mg fenolu.g<sup>-1</sup>). Nejvyšší množství fenolických látek extrahovatelných vodou obsahují řepík, máta, dobromysl a stévie, nejmenší potom hluchavka, levandule, ruta a vlašatičnick. S výjimkou čajovníku a mateřídoušky obsahují zkoumané rostliny více fenolů extrahovatelných horkou vodou.

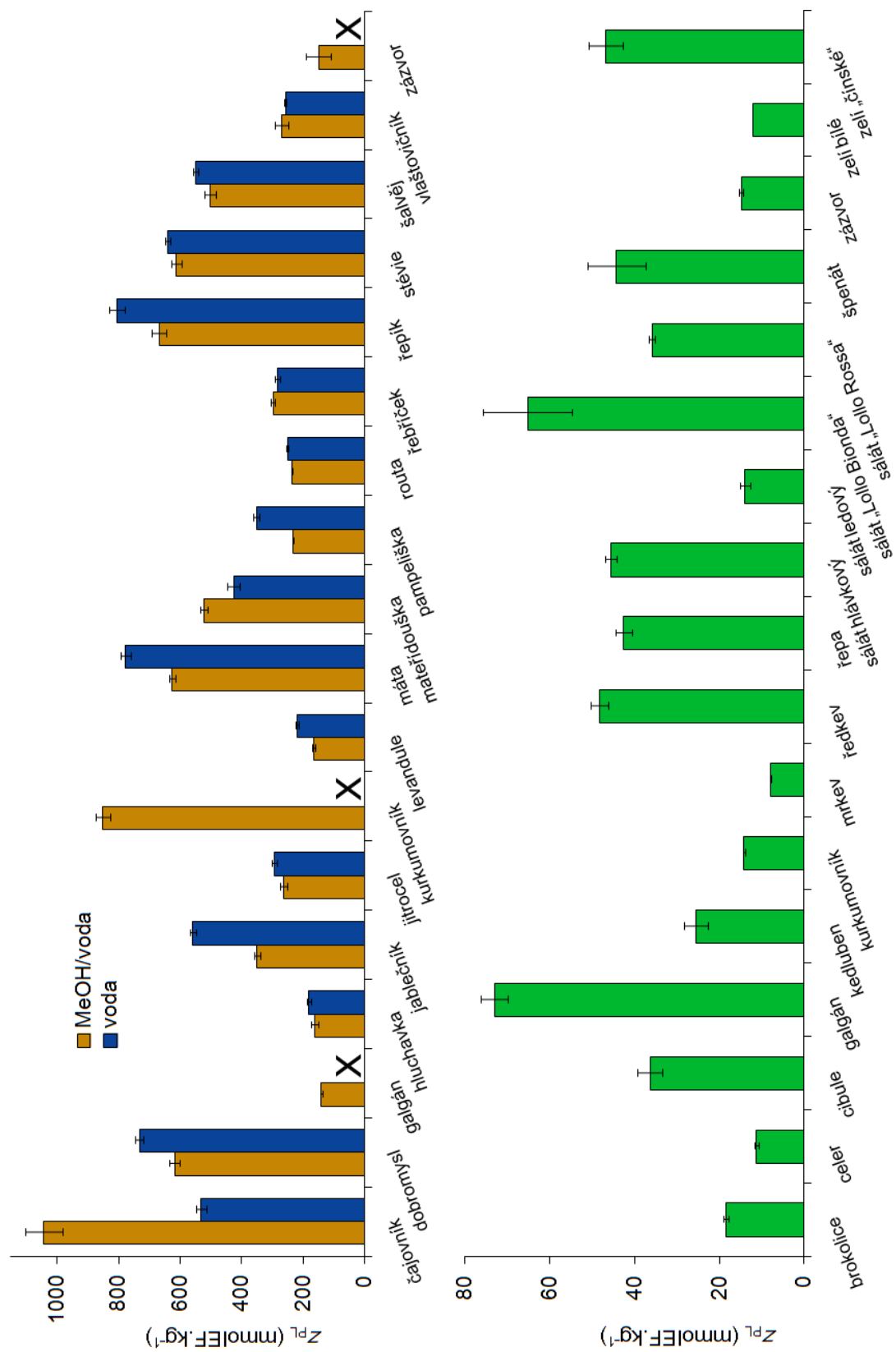
U zeleniny extrahované odšťavněním byly získány hodnoty obsahu fenolických látek v rozmezí 7,9–73,1 mmolEF.kg<sup>-1</sup> (0,74–6,87 mg fenolu.g<sup>-1</sup>) – průměr potom činí 32,7 mmolEF.kg<sup>-1</sup> (3,10 mg fenolu.g<sup>-1</sup>). Ke druhům obsahujícím nejnižší množství fenolických látek v sušině patří mrkev, celer, bílé zelí a kurkumovník; nejvyšší obsah těchto látek naopak náleží galgánu a salátu „Lollo Bionda“ nebo např. řepě, špenátu či ledovému salátu. Zelenina tedy celkově obsahuje průměrně cca 13krát méně fenolických látek extrahovatelných odšťavněním než byliny látek extrahovatelných vodou či methanolem.

Výsledky stanovení flavonoidů jsou na obrázku 4.2 na straně 49.

Pro rostliny extrahované methanolem vychází obsah flavonoidů v intervalu 24,5–242 mmolEK.kg<sup>-1</sup> (7,4–73,3 mg kvercetinu.g<sup>-1</sup>) s průměrnou hodnotou

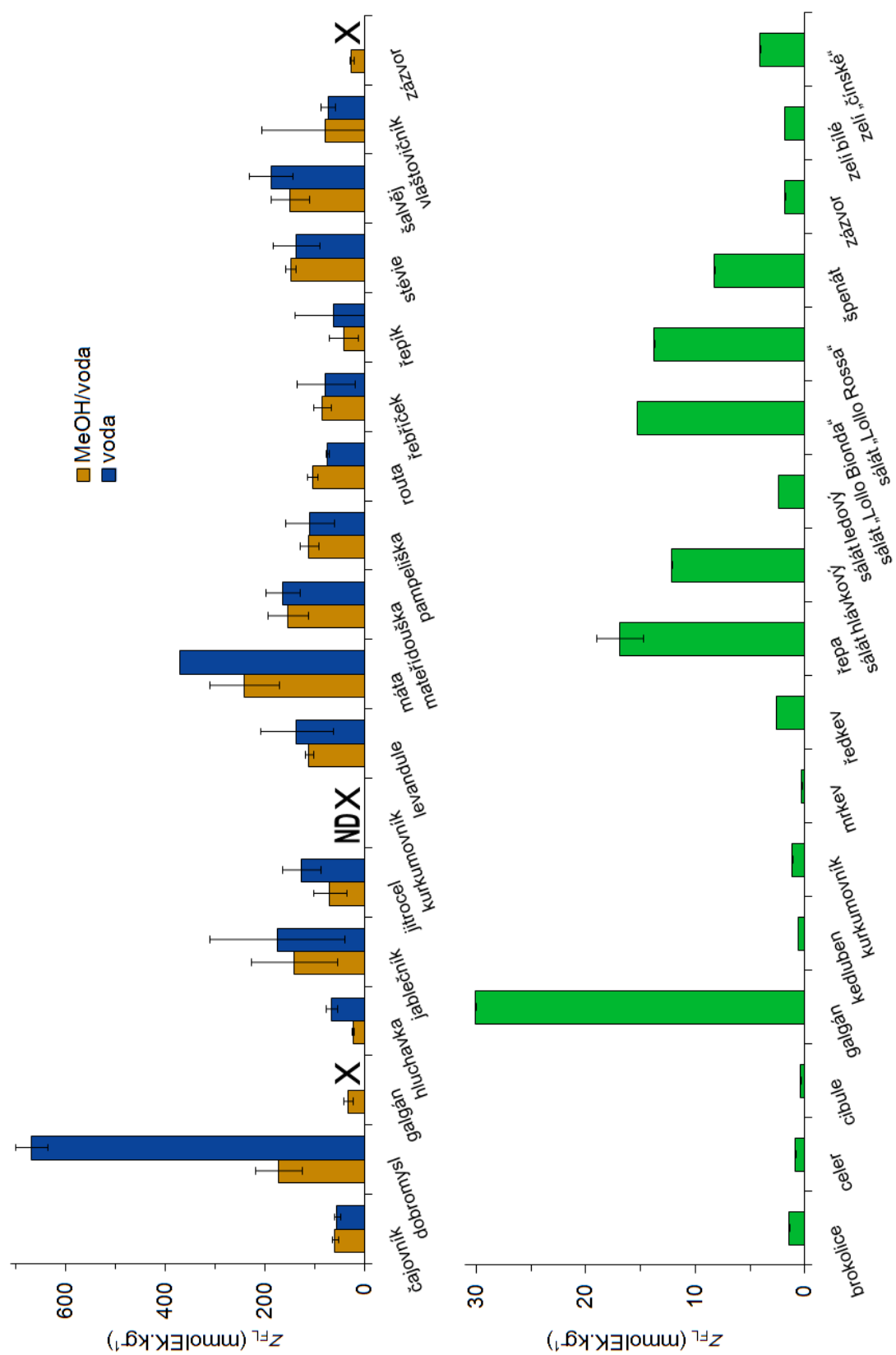
104 mmolEK.kg<sup>-1</sup> (31,4 mg kvercetinu.g<sup>-1</sup>). Nejvíce těchto látek obsahuje máta, dobromysl, mateřídouška a šalvěj, nejméně zase hluchavka, zázvor, galgán a řepík. Hodnotu pro methanolvý extrakt kurkumovníku nebylo možné získat, neboť slepý vzorek vykázal vyšší absorbanci než měrný. V rámci extrakce horkou vodou byly u rostlin nalezeny hodnoty v rozmezí 56,6–669 mmolEK.kg<sup>-1</sup> (17,1–202 mg kvercetinu.g<sup>-1</sup>) a s průměrem 167 mmolEK.kg<sup>-1</sup> (50,5 mg kvercetinu.g<sup>-1</sup>); dobromysl obsahuje z celého souboru zdaleka nejvíce flavonoidů extrahovatelných vodou – je následována mátou, šalvějí, jablečníkem a mateřídouškou –, naproti tomuto u čajovníku, řepíku a hluchavky byl nalezen nejnižší obsah flavonoidů. Vodnou extrakcí je možné získat průměrně o 60 % více flavonoidů.

Obsah flavonoidů v zelenině se pohybuje mezi 0,3–30,1 mmolEK.kg<sup>-1</sup> (0,1–9,1 mg kvercetinu.g<sup>-1</sup>), průměrně 6,7 mmolEK.kg<sup>-1</sup> (2,0 mg kvercetinu.g<sup>-1</sup>). Nejvíce flavonoidů bylo zjištěno u galgánu, řepě a salátu „Lollo Bionda“, nejméně naopak u mrkve, cibule, kedlubnu a celeru. Zelenina podle všeho v sušině obsahuje průměrně 20krát menší množství flavonoidů než zkoumané byliny.



Obrázek 4.1: Výsledky stanovení fenolických látek – molární zastoupení ekvivalentů fenolu v sušině výchozího materiálu.  
 X ... extrakce vodou neprovedena





Obrázek 4.2: Výsledky stanovení flavonoidů – molární zastoupení ekvivalentů kvercetinu v sušíně výchozího materiálu.  
 X ... extrakce vodou neprovedena, ND ... nedetekováno

### 4.3 Výsledky stanovení antioxidačních vlastností

V následujícím oddíle jsou představeny výsledky získané užitím tří metod stanovení antioxidačních vlastností, a to jmenovitě metody TEAC – antioxidační kapacity vyjádřené v ekvivalentech troloxu – s ABTS (odstavec 3.4.7 na straně 37) a DPPH (ad 3.4.8 na straně 38) a metody FRAP – antioxidační síly založené na redukci železitého iontu (k 3.4.9 na straně 40).

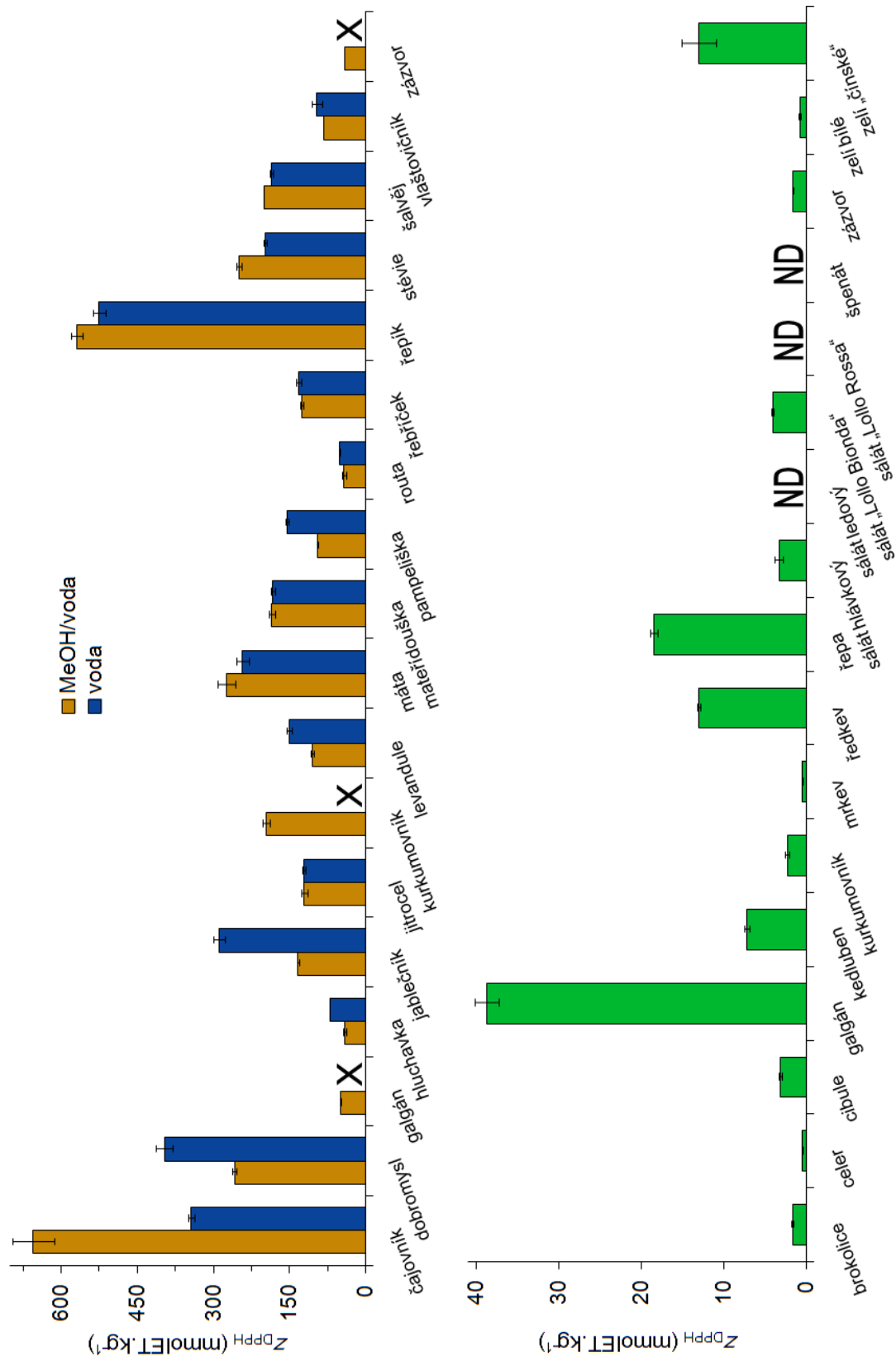
Výsledky stanovení antioxidačních vlastností s DPPH jsou uvedeny v podobě grafu na obrázku 4.3 na následující straně – jsou vyjádřeny v podobě molárního zastoupení ekvivalentů troloxu v sušině.

U bylin byl nalezen obsah antioxidačních látek extrahovatelných methanolovým roztokem mezi 41,3 a 655 mmolET.kg<sup>-1</sup> (odpovídá 10,3–164 mg troloxu.g<sup>-1</sup>) s průměrnou hodnotou 191 mmolET.kg<sup>-1</sup> (47,7 mg troloxu.g<sup>-1</sup>); nejvyšší antioxidační vlastnosti v tomto případě vykazují čajovník, řepík, máta, dobromysl a stévie, nejnižší hluchavka, vlašovičník, routa a galgán. Pro extrakci horkou vodou se zastoupení pohybuje v rozmezí 52,3–525 mmolET.kg<sup>-1</sup> (13,1–131 mg troloxu.g<sup>-1</sup>) a průměrná hodnota činí 210 mmolET.kg<sup>-1</sup> (52,5 mg troloxu.g<sup>-1</sup>). Jako rostliny s nejvyšším množstvím antioxidantů extrahovatelných vodou se ukázaly být řepík, dobromysl, čajovník a jablečník, naopak nejméně jich je u routy, hluchavky a šalvěje. Nalezený obsah antioxidantů je mírně zvýšený (cca o 10 %), pokud byla použita extrakce vodou.

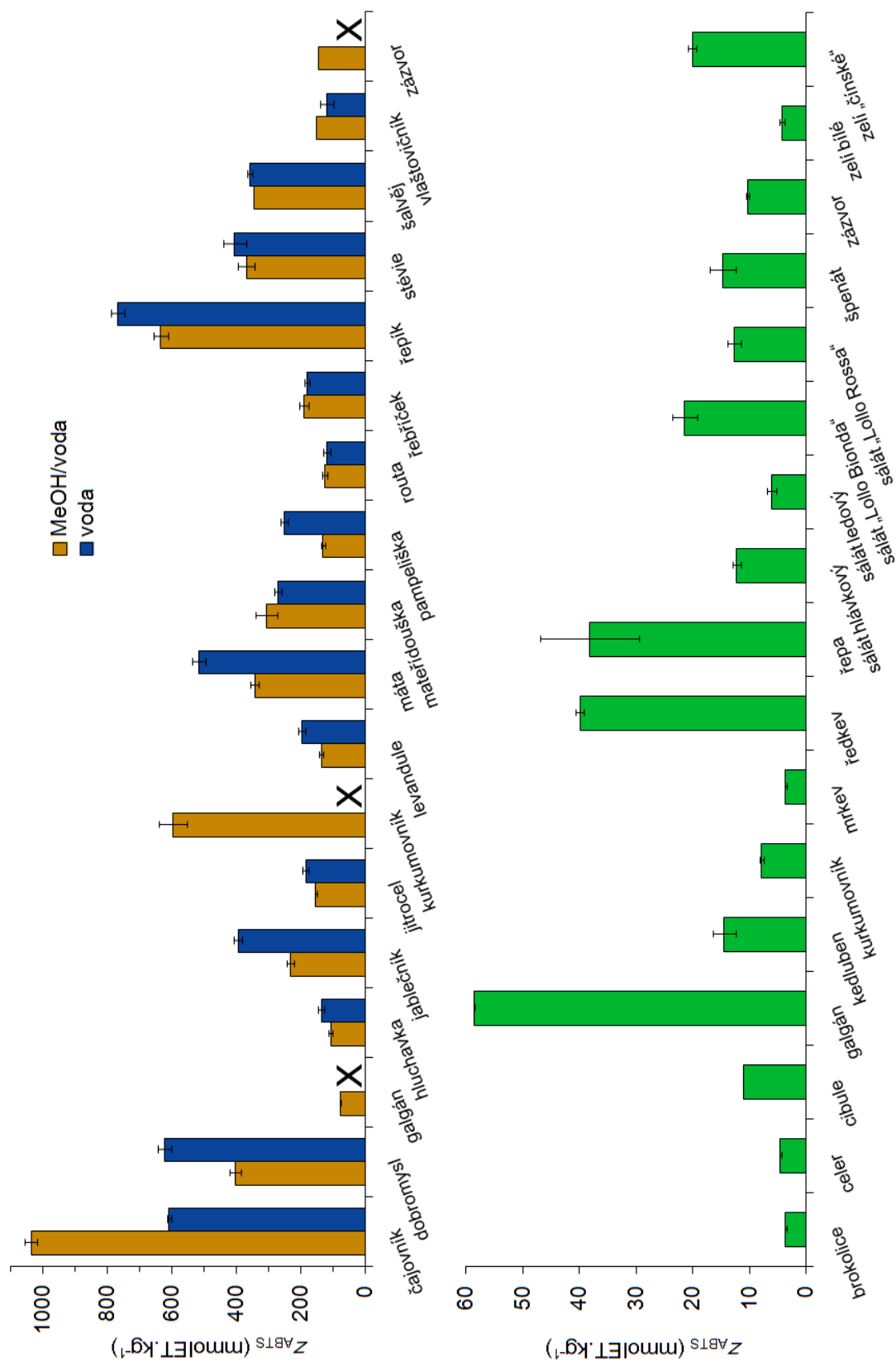
Obsah antioxidantů stanovený touto metodou se v zelenině pohybuje v rozmezí 0,6 a 38,7 mmolET.kg<sup>-1</sup> (0,2–9,7 mg troloxu.g<sup>-1</sup>) a průměrná hodnota je 7,8 mmolET.kg<sup>-1</sup> (2,0 mg troloxu.g<sup>-1</sup>). Nejvyšší obsah byl naměřen u galgánu, řepy, ředkve a čínského zelí a nejnižší potom u mrkve, celeru a bílého zelí. V případě ledového salátu, salátu „Lollo Rossa“ nebylo možné získat hodnoty absorbance měrného roztoku; bylo totiž nutné pracovat při nulovém zředění (tj. s čistými extrakty) a během reakce se vytvořila značná sraženina (reakce prováděna v 75%v ethanolu). Pokud by hodnoty byly získány, tyto rostliny by se nepochybně zařadily s obsahem antioxidačních látek nejnižší.

Hodnoty stanovené u zeleniny jsou průměrně 25krát nižší než hodnoty náležející bylinným drogám.

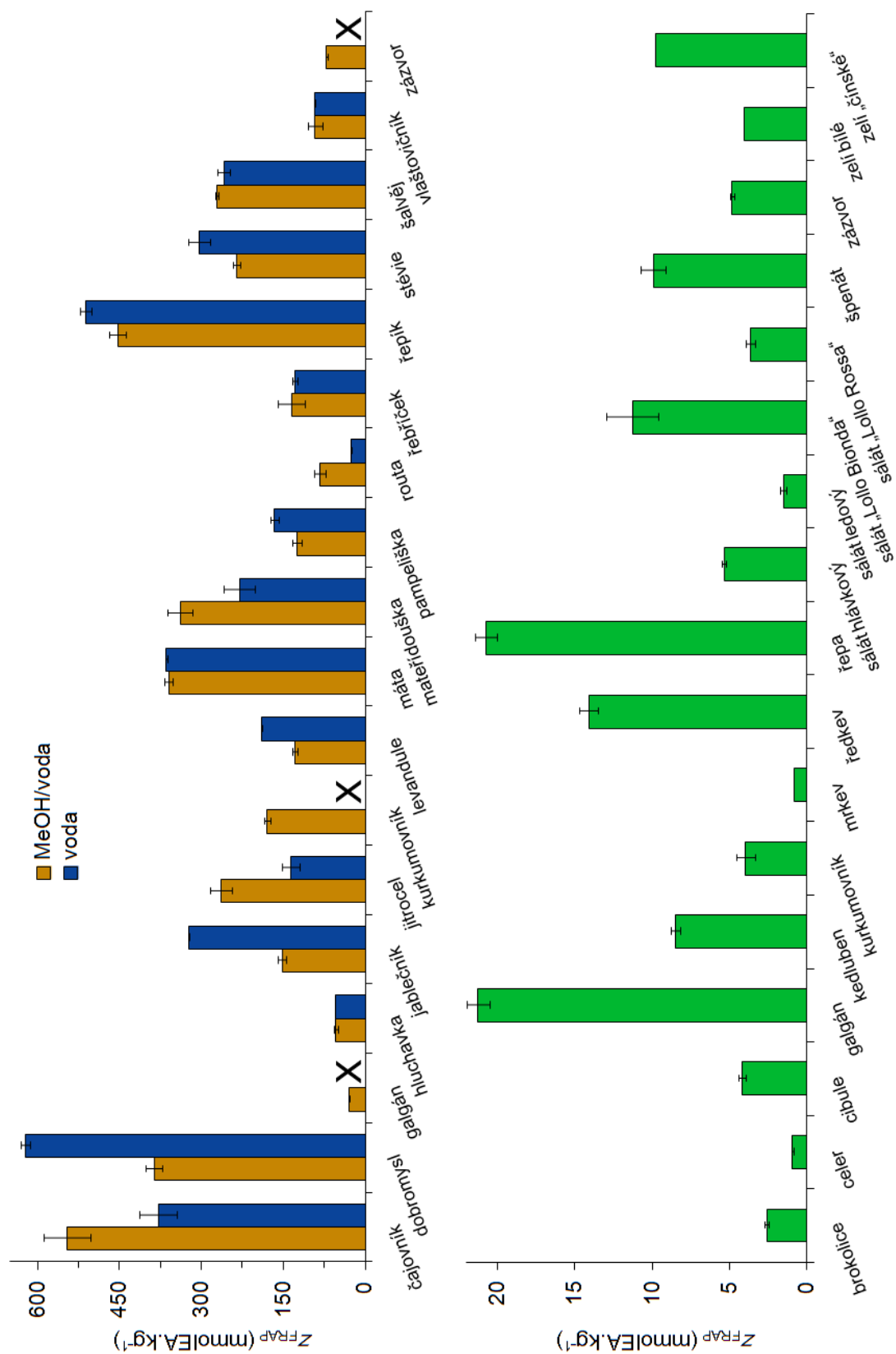
Na obrázku 4.4 na straně 52 se nalézají výsledky stanovení antioxidačních vlastností s ABTS, jež jsou rovněž vyjádřeny v podobě molárního zastoupení troloxu v sušině výchozího materiálu.



Obrázek 4.3: Výsledky stanovení antioxidačních vlastností metodou DPPH – molární zastoupení ekvivalentů troloxu v sušině.  
 X ... extrakce vodou neprovedena, ND ... nedetekováno



Obrázek 4.4: Výsledky stanovení antioxidačních vlastností metodou ABTS – molární zastoupení ekvivalentů troloxu v sušině.  
X ... extrakce vodou neprovedena



Obrázek 4.5: Výsledky stanovení antioxidačních vlastností metodou FRAP – molární zastoupení ekvivalentů askorbátu v sušině.  
 X ... extrakce vodou neprovedena

Po extrakci methanolovým roztokem byl u bylin zjištěn obsah antioxidačních látek 78,9–1038 mmolET.kg<sup>-1</sup> (19,8–260 mg troloxu.g<sup>-1</sup>) s průměrem 306 mmolET.kg<sup>-1</sup> (76,6 mg troloxu.g<sup>-1</sup>); nejvyšší množství jich obsahují čajovník, řepík a kurkumovník, nejnižší množství bylo nalezeno u galgánu, hluchavky a routy. Co se týče antioxidantů získatelných extrakcí vodou, zde se hodnoty molárního zastoupení pohybují v mezích 120–769 mmolET.kg<sup>-1</sup> (30,0–193 mg troloxu.g<sup>-1</sup>) při průměrné hodnotě 344 mmolET.kg<sup>-1</sup> (86,0 mg troloxu.g<sup>-1</sup>). Nejnižší obsah antioxidačních látek se nachází u vlašovičnicku, routy a hluchavky, nejvyšší obsah je možné najít u řepíku, dobromysli, čajovníku a máty. Průměrně tedy rostliny obsahují přibližně o 12 % více antioxidačních látek extrahovatelných horkou vodou než látek extrahovatelných methanolem.

V případě zeleniny obsah látek s antioxidačními vlastnostmi dosahuje průměrně cca 20krát nižších hodnot než u výše zmíněných bylin; nalezená čísla jsou v rozmezí 3,7–58,5 mmolET.kg<sup>-1</sup> (0,93–14,6 mg troloxu.g<sup>-1</sup>) a průměrně činí 16,7 mmolET.kg<sup>-1</sup> (4,2 mg troloxu.g<sup>-1</sup>). Nejvíce antioxidantů získatelných odšťavněním bylo zjištěno u galgánu, ředkve a řepy, nejméně u mrkve, brokolice, bílého zelí a celeru.

Výsledky stanovení antioxidačních vlastností metodou FRAP jsou uvedeny v grafech na obrázku 4.5 na předchozí straně. Obsah antioxidantů je v tomto případě vyčíslen jako molárního zastoupení ekvivalentů askorbátu v sušině výchozího materiálu.

V sušině bylin bylo při použití extrakce methanolovým roztokem nalezeno zastoupení antioxidačních látek 29,6–546 mmolEA.kg<sup>-1</sup> (5,2–95,7 mg askorbátu.g<sup>-1</sup>) se střední hodnotou 217 mmolEA.kg<sup>-1</sup> (38,0 mg askorbátu.g<sup>-1</sup>). Nejvyšší obsah antioxidantů extrahovatelných methanolem byl touto metodou nalezen u čajovníku, řepíku, dobromysli, máty a také u mateřídoušky. Galgán, hluchavka a zázvor naproti tomu obsahují těchto látek nejméně. Pro extrakci vodou se získané hodnoty zastoupení antioxidačních látek v sušině pohybují v intervalu 26,1–622 mmolEA.kg<sup>-1</sup> (4,6–109 mg askorbátu.g<sup>-1</sup>), průměrně 252 mmolEA.kg<sup>-1</sup> (44,2 mg askorbátu.g<sup>-1</sup>). Nejvyšší obsah antioxidačních látek vykazuje dobromysl, řepík, čajovník, máta a jablečník, nejméně antioxidačních látek extrahovatelných vodou bylo zjištěno u routy, hluchavky a vlašovičnicku. Znovu se projevuje nepatrně (zde průměrně o 16 %) vyšší obsah látek s antioxidačními vlastnostmi, jež jsou z daných rostlin extrahovatelné vodou.

U zeleniny činí hodnoty zastoupení antioxidačních látek v sušině 0,9–21,3 mmolEA.kg<sup>-1</sup> (0,15–3,7 mg askorbátu.g<sup>-1</sup>) s průměrnou hodnotou 7,5 mmolEA.kg<sup>-1</sup> (1,3 mg askorbátu.g<sup>-1</sup>); nejvíce těchto látek je možné získat z galgánu, řepy a ředkve, nejméně jich pak obsahují mrkev, celer a ledový salát. V případě této metody jsou hodnoty u zeleniny v průměru 30krát nižší než u bylinných drog.

Obecně lze na závěr říci, že nejvyšší obsah antioxidačních látek byl v rámci všech

třech metod stanovení antioxidačních vlastností nalezen v případě „bylin“ u čajovníku, řepíku, dobromysli a máty a v rámci „zeleniny“ u galgánu, řepy, ředkve a salátu „Lollo Bionda“. Nejnižší množství extrahovatelných antioxidantů bylo shledáno v případě „bylin“ u galgánu, hluchavky, routy a vlašovičnicku a v případě „zeleniny“ pak u mrkve, celeru, ledového salátu a bílého zelí.

## 4.4 Korelační analýza

Pro zhodnocení do jaké míry spolu stanovené veličiny korelují, tj. vykazují lineární závislost, byly vypočteny Pearsonovy korelační koeficienty; výsledky těchto včetně příslušných  $P$ -hodnot významnosti jsou uvedeny v tabulce 11.  $P$ -hodnoty korelačních koeficientů u všech prošetřovaných korelací se vyskytují v intervalu  $(0; \alpha)$  a získané korelační koeficienty je tedy možno označit za statisticky signifikantní na hladině významnosti 0,05.

Na obrázcích 4.6 na následující straně a 4.7 na straně 57 jsou grafická znázornění šetřených závislostí s uvedením korelačních rovnic.

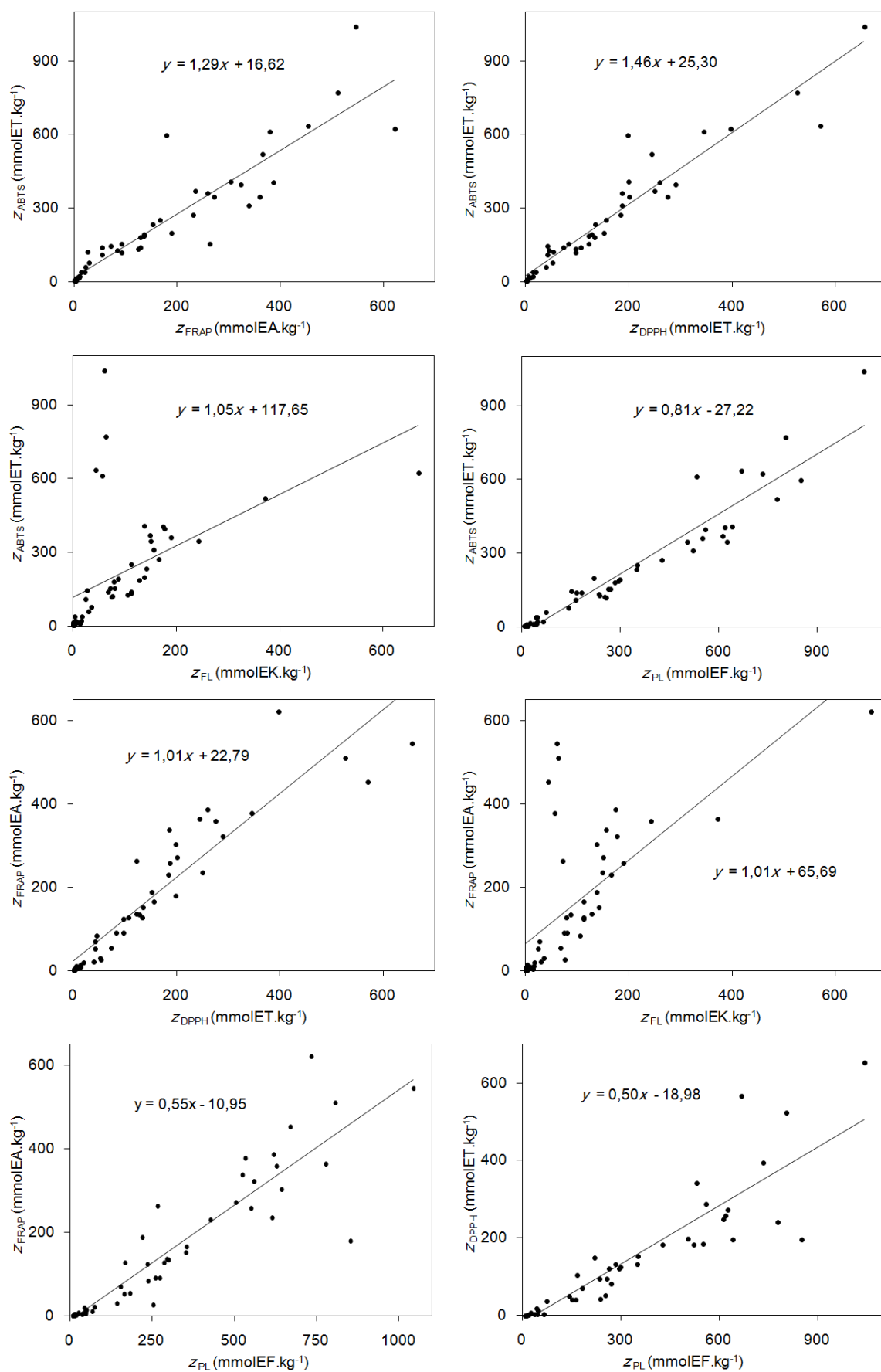
Tabulka 11: Korelační koeficienty vzájemných závislostí stanovených veličin.

$R$	ABTS	FRAP	DPPH	flavonoidy	fenolické látky
ABTS	—	0,9217 $P = 2.10^{-21}$	0,9584 $P = 4.10^{-26}$	0,5197 $P = 0,001$	0,9575 $P = 1.10^{-27}$
FRAP	—	—	0,9326 $P = 2.10^{-21}$	0,6835 $P = 6.10^{-8}$	0,9138 $P = 2.10^{-20}$
DPPH	—	—	—	0,4488 $P = 0,002$	0,8947 $P = 2.10^{-17}$
flavonoidy	—	—	—	—	0,6339 $P = 10^{-6}$

Jak vyplývá z tabulky 11, závislosti molárního zastoupení ekvivalentů troloxu (metody TEAC s DPPH a ABTS) i metoda FRAP mezi sebou navzájem velmi dobře korelují ( $R \geq 0,9$ ), podobně je tomu i v případě jejich závislosti na obsahu fenolických látek. Výrazně méně korelují zmíněné veličiny s obsahem flavonoidů ( $R \leq 0,7$ ).

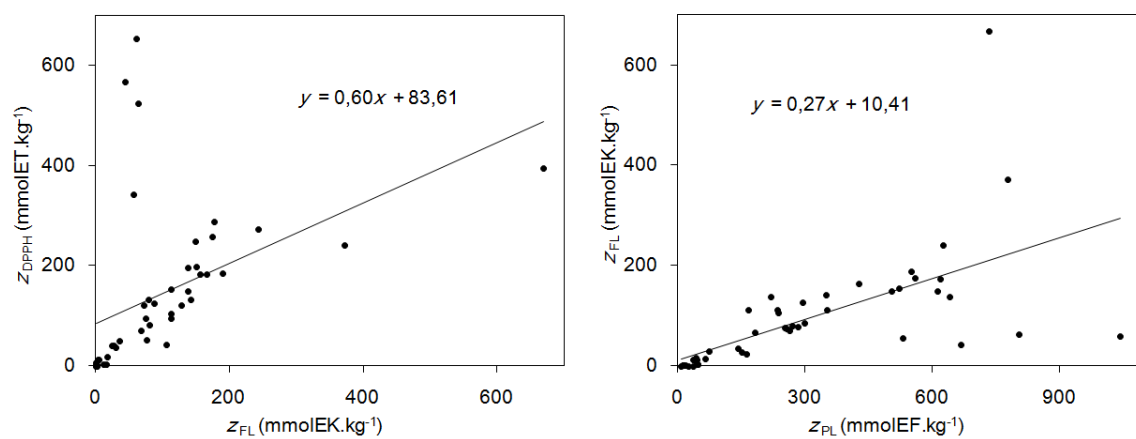
Nejtěsnější korelační závislost na sobě vykazují obsah antioxidačních látek zjištěný metodou ABTS a DPPH (tedy obě varianty TEAC) a obsah fenolických látek ( $R \geq 0,95$ ).

Z těchto výsledků lze konstatovat, že ve většině případů platí: Je-li hodnota obsahu fenolických látek zjištěná metodou dle Folina-Ciocalteu vysoká, je vysoký i obsah antioxidačních látek stanovitelných metodami TEAC a FRAP.



Obrázek 4.6: Korelační závislosti stanovených veličin – část první.





Obrázek 4.7: Korelační závislosti stanovených veličin – část druhá.

## 5 Diskuze

Pro celý proces – od sběru a sušení až po extrakci a uchování – není možné, pokud nejsou přijata patřičná opatření v podobě např. práce v inertní atmosféře a za nižších teplot, zabránit obecným degradačním procesům jako jsou oxidace (působení vzdušného kyslíku, fotooxidace), hydrolýzy a podobně. Všechny dosažené hodnoty antioxi-dačních vlastností rostlin je tedy nutno chápat tak, že pouze kvantifikují minimální množství antioxidačních látek, jež je v daném okamžiku přítomno v extraktu, ale které zároveň nemusí odpovídat a zřejmě také neodpovídá skutečnému obsahu v živé rostlině.

I přes to, že většina stanovovaných rostlin byla při extrakci použita ve formě usušeného materiálu, jenž byl před tím uchováván různě dlouhou dobu (až několik měsíců) ve tmě při pokojové teplotě, a neodrážejí tak stav v živé rostlině, mohou výsledky poskytnout dobrou představu o antioxidačním působení v potravě člověka, neboť právě většina léčivých rostlin se konzumuje v podobě nálevů a odvarů, jež jsou téměř vždy připravovány ze sušeného rostlinného materiálu, který také nebývá šetrně skladován.

Extrakční výtěžnost by se zřejmě dala zvýšit cílenější volbou rozpouštědla na základě polaritý látek, jež mají být extrahovány, mícháním během extrakce (zde se nabízí perkolační techniky s využitím Soxhletova extraktoru), užitím jemnějšího rostlinného materiálu (např. ve formě prášku), prodloužením extrakční doby nebo nakonec i zvýšením teploty; prodlužování doby a zvyšování teploty by však mohlo vést také ke zvýšené tvorbě artefaktálních látek – bylo by tedy nutné zvolit kompromis.

Zbytky po vysušení extraktu – odparky – by za předpokladu dalšího použití bylo nepochybně vhodnější připravovat šetrnější lyofilizační cestou či alespoň odpařováním při nižší teplotě s využitím sníženého tlaku. Byla by tak významně redukována možnost průběhu Maillardových reakcí a dalších degradačních procesů, jež by jinak mohly velkou měrou ovlivnit výsledky následujícího výzkumu. Zvláště v případě extraktů zeleniny (šťáv) se již během extrakce a při pozdějším sušení projevovalo silné hnědnutí a změna senzorických vlastností.

Některé z produktů Maillardových reakcí (MRP), tedy látek vzniklých za zvýšené teploty a snížené aktivity vody převážně kondenzacemi běžně se vyskytujícími složek biologického materiálu, podle všeho také vykazují antioxidační vlastnosti [2, 44], avšak byla také zaznamenána vyšší pravděpodobnost vzniku toxických nebo karcinogenních sloučenin; k velmi známým příkladům patří akrylamid vznikající při zahřívání směsí bohatých na sacharidy.

Jelikož se při více než polovině extrakcí vycházelo z usušeného rostlinného mate-

riálu, jsou všechny výsledky vztaženy přednostně na sušinu, tj. na rostlinný materiál zbavený nevázané vody. Pro vyhodnocení antioxidačních vlastností vztažených na čerstvou hmotu by bylo nutné znát i výchozí hmotnost u léčivých rostlin.

V případě zeleniny je možné výsledné hodnoty vynásobit faktorem  $(1 - w_{TL})$  a získat tak hodnoty vztažené na čerstvý výchozí materiál (průměrně se obsah vody pohybuje kolem 90 %w). U bylin se teoreticky může použít přibližný odhad tohoto faktoru jako 0,1 (cca 90 %w vody) – v obou případech lze při zanedbání konkrétních hodnot konstatovat, že hodnoty pro čerstvý rostlinný materiál jsou desetkrát nižší než hodnoty vztažené na sušinu.

Vyšší hodnoty obsahu netěkavých látek v extraktech zeleniny jsou nejspíše způsobeny přítomností makromolekul (proteinů, polysacharidů apod.), jelikož nebylo při přípravě použito zvýšené teploty a rovněž byl použit filtr o větším průměru pórů než v případě většiny extraktů vodných/methanolových.

Jak již bylo řečeno v Úvodu, zde použitá metoda stanovení flavonoidů poskytuje informaci o množství volných flavonoidů, jež obsahují motiv karbonyl-hydroxyl (popř. i katechol). I toto je však určité omezení – komplexy vznikající na seskupení karbonyl-hydroxyl a katechol se mohou lišit v absorpčních vlastnostech a navíc se ve strukturách flavonoidů často ani nevyskytují na stejných polohách. Ve velmi složitých vzorcích, jimiž připravené extrakty bezesporu jsou, se navíc můžou projevit interference způsobené jinými druhy látek, které mohou v daném oboru rovněž absorbovat – obzvláště v tak silně zásaditém prostředí. Jistým východiskem by mohlo být vynechat přídavek dusitanu draselného a hydroxidu sodného a absorbanci poté měřit při nižší vlnové délce (cca 400–450 nm) [45].

Flavonoidy vázané ve formě glykosidů, ve kterých jsou cukerné substituenty přímo vázané na jednom z komplexotvorných atomů kyslíku nebo stericky brání koordinaci hlinitého iontu, by neměly být detekovatelné. K přesnějšímu stanovení flavonoidů, lépe tedy flavonolů, touto metodou by mohlo vést provedení prvotní hydrolýzy (chemické [46, 36] či enzymové [40]) všech glykosidů ve vzorku. Další aplikovatelnou metodou je využití vysokoúčinné kapalinové chromatografie, ta však vyžaduje množství finančně nákladných standardů zkoumaných flavonoidů.

Během kalibrace metody se pro čistý kvercetin projevila nelinearita Lambertova-Beerova zákona, a to již při nízkých koncentracích; od jisté kritické molární koncentrace kvercetinu byla zaznamenána náhlá změna směrnice závislosti a tato znemožnila využití širšího kalibračního rozmezí. V koncentrovanějších roztocích zřejmě dochází ke změně stechiometrie tvořeného komplexu nebo se počínají projevovat vlivy disperze v důsledku postupného překročení rozpustnosti kvercetinu.

Nalezené hodnoty antioxidační aktivity i obsahu fenolických látek jsou poměrně vysoké pro léčivé rostliny a řádově nižší pro zeleninu (přibližně 25krát); toto pozorování souhlasí s již publikovaným zjištěním [36]. Zde je však potřeba podotknout, že ačkoliv léčivé rostliny obsahují za daných podmínek v sušině mnohem více látek s antioxidačními vlastnostmi, ve vztahu k člověku je relevantní také uvažovat množství, které se běžně konzumuje – v případě léčivých rostlin, čajů a apod. se jedná o stovky miligramů až gramy usušeného materiálu, naproti tomu množství čerstvé zeleniny přijaté člověkem se pohybuje v řádu desítek až stovek gramů. Z výsledků (např. podle TEAC s ABTS) pro srovnání vyplývá, že vypití mátového čaje (nálevu) připraveného z 1 g drogy je srovnatelné s konzumací nejvýše 380 g ředkvi (je totiž třeba brát v potaz potenciální nižší extraktivnost při mnohem kratší přípravě nálevu a naopak také konzumaci celého rostlinného materiálu v případě ředkve, nikoliv pouze šťávy).

Štáva ze zeleniny nejspíše také obsahovala na rozdíl od usušených rostlin před extrakcí značný podíl kyseliny askorbové (vitaminu C), jež byla však pravděpodobně z části degradována během extrakce nebo při provádění jednotlivých stanovení (práce se zředěnými roztoky). Vlastní orientačně provedený experiment totiž prokázal poměrně značnou rychlost fotodegradace kyseliny askorbové v destilované vodě vykazující zřejmě kinetiku nultého řádu (vyhovuje rovnici  $-\frac{dc}{dt} = k$ ; koncentrace askorbátu měřena metodou FRAP): rychlostní konstanta na běžném denním světle činí přibližně  $34 \mu\text{mol.L}^{-1}.\text{hod}^{-1}$  oproti hodnotě  $19 \mu\text{M.hod}^{-1}$  zjištěné u kontroly umístěné ve tmě.

Dále je třeba uvést, že extrakty bylin a zeleniny nebyly připravovány stejným způsobem a v případě zeleniny by extrakce vodou či methanolovým roztokem za zvýšené teploty mohla vést k vyšším hodnotám antioxidační aktivity. Dobrým dokladem tohoto jsou zázvor, kurkumovník a galgán, u nichž byly zjištěny vyšší hodnoty právě po extrakci methanolem.

Zjištěné antioxidační aktivity tedy přímo závisí na použitém extrakčním médiu a extrakčním postupu a nikdy nemohou plně pokrýt celkový obsah všech antioxidantů – stejně tak ani metody antioxidačního stanovení nikdy nepokrývají všechny skupiny antioxidantů (jmenovitě např. karotenoidy jsou metodami TEAC a FRAP „diskriminovány“ [6]). Z tohoto důvodu je žádoucí při studiu antioxidačních vlastností využít více různých metod, a pokud to možnosti dovolují nejlépe metod, jež pracují na zcela odlišných mechanismech [14], aby byl získán co nejobecnější pohled na antioxidační profil ve vodném i hydrofobním prostředí – obě prostředí jsou totiž v biologických systémech relevantní. Užitím širšího spektra metod se také do jisté míry může eliminovat vliv nejrůznějších interferencí – u kolorimetrických metod jsou problematické zvláště překryvy absorpčních spekter stanovovaných látek a činidel nebo dokonce jejich změny během prováděné reakce (to pak zcela znemožňuje užití slepého vzorku).

Výsledky korelační analýzy potvrzují předpoklad, že již z principu by antioxidační aktivity stanovené metodami využívajícími podobný mechanismus (zde převážně SET) měly mezi sebou vykazovat velmi dobrou lineární korelaci, a jsou tak v souladu s literaturou [36, 37]. V případě obsahu fenolických látek a antioxidačních aktivit byla rovněž nalezena dobrá korelace, což však není překvapující, neboť metoda dle Folina a Ciocâlțea je dnes považována do jisté míry jako další metoda stanovení redukčních (antioxidačních) vlastností. Obsah flavonoidů ve vztahu k antioxidačním aktivitám vykazuje pouze slabou korelaci, možné důvody pro toto zjištění byly nastíněny v předchozím textu; při vyloučení vysokých hodnot by pravděpodobně korelace mohla být příznivější.

V práci získané výsledky stanovení antioxidačních vlastností a výsledky skupinových stanovení je možné porovnat s výsledky v odborné literatuře jen ve velmi omezené míře. Málokdy jsou totiž dodrženy podmínky stejného způsobu extrakce či provedení jednotlivých stanovení. Navíc se antioxidační vlastnosti zjištěné u rostlin mění i v závislosti na ročním období, na zeměpisné šířce, na použitém rostlinném poddruhu / odrůdě a mnoha dalších faktorech [40].

Během řešení práce se objevila možnost využít chromatografie na tenké vrstvě (TLC) jako další metody charakterizace připravených extraktů s možností použití radikálů DPPH či ABTS pro přímou detekci antioxidačních vlastností konkrétních sloučenin po separaci. Pro celkovou časovou náročnost již daných cílů práce však nebylo možné tuto metodiku včas zpracovat do publikovatelné podoby a je tedy zatím pouze ve fázi počátečních pokusů. Obtížným úkolem je v tomto ohledu zejména nalezení vhodné mobilní fáze pro vývoj TLC chromatogramů u tak složitých vzorků, jakými jsou rostlinné extrakty.

I v případě antioxidačních látek platí pravidlo „Všeho moc škodí.“ Je mnohem výhodnější a leckdy i bezpečnější přijímat antioxidanty v přirozené formě směsí, tj. v pestré škále zeleniny, ovoce, ale i výrobků živočišného původu, než se snažit o umělé „nabohacování“ konkrétních antioxidantů pomocí léčivých přípravků a doplňků stravy [9]. Vzhledem k potenciálnímu prooxidačnímu efektu každého antioxidantu je toto konání nežádoucí a spíše člověku uškodí.

Předkládaná práce neměla za cíl obsáhnout všechny druhy léčivých rostlin, z časových důvodů by to ani nebylo možné. Pro další studium problematiky antioxidačních vlastností (léčivých) rostlin se nabízí celá řada druhů, jež jsou používány a tím pádem i studovány v menší míře, ale které by mohly skrývat potenciální využití – např. některé běžně se vyskytující stromové druhy, exotické koření, ale i v přírodě volně rostoucí byliny a keře.

## 6 Shrnutí

- Byl zpracován literární úvod shrnující problematiku reaktivních forem kyslíku, antioxidačních vlastností rostlin a metod jejich stanovení.
- Z vybraných 32 druhů dostupných léčivých rostlin a zeleniny bylo třemi základními způsoby získáno celkem 50 extraktů.
- U extraktů byla provedena základní stanovení fenolických látek, flavonoidů a antioxidační aktivity (metodami TEAC s DPPH nebo ABTS a metodou FRAP) a též stanovení gravimetrická podle lékopisu. Nejvyšší obsah extrahovatelných antioxidačních látek a fenolických látek byl zjištěn u čajovníku (*Camellia sinensis* L.), řepíku (*Agrimonia eupatoria* L.), dobromysli (*Origanum vulgare* L.) a máty (*Mentha x piperita* L.). Nejvyšší obsah flavonoidů byl zjištěn u dobromysli, máty a šalvěje (*Salvia officinalis* L.). Zelenina obsahuje řádově méně antioxidačních látek, fenolických látek i flavonoidů; nejvyšší jejich obsah byl zaznamenán u galgánu (*Alpinia* ROXB.), řepy (*Beta vulgaris* L.) a ředkve (*Raphanus sativus* L.).
- Extrakce horkou vodou byla nepatrně účinnější než extrakce horkým 80%w methanolovým roztokem.
- Výsledky stanovení antioxidační aktivity a výsledky stanovení fenolických látek vykazují vzájemně velmi dobrou korelační závislost ( $R \geq 0,9$ ).
- Získané extrakty mohou být dále použity pro analýzu pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie a pro testování jejich potenciálního cytostatického působení na nádorové buňky.

## Reference

- [1] BARTWAL, A.; MALL, R.; LOHANI, P.; GURU, S. K.; ARORA, S.: *J. Plant Growth Regul.* **32**:216-232 (2013).
- [2] OSADA, Y.; SHIBAMOTO, T.: *Food Chem.* **98**:522-528 (2006).
- [3] MITTLER, R.: *Trends Plant Sci.* **7**:405-410 (2002).
- [4] McKERSIE, B. D.: *Oxidative Stress*. In *Plant Stress*. [online]. Kanada: 1996. [cit. 2013-08-07]. URL: <http://www.plantstress.com/articles/oxidative%20stress.htm>.
- [5] GILL, S. S.; TUTEJA, N.: *Plant Physiol. Bioch.* **48**:909-930 (2010).
- [6] GÜLCIN, I.: *Arch. Toxicol.* **86**:345-391 (2012).
- [7] *Wikipedia, the Free Encyclopedia*. [online]. [cit. 2013-08-15]. URL: <http://en.wikipedia.org/>.
- [8] ALSCHER, R. G.; DONAHUE, J. L.; CRAMER, C. L.: *Physiol. Plant.* **100**:224-233 (1997).
- [9] HERBERT, V.: *J. Nutr.* **126**:1197-1200s (1996).
- [10] BLOKHINA, O.; VIROLAINEN, E.; FAGERSTEDT, K. V.: *Ann. Bot.* **91**:179-194 (2003).
- [11] DAVIES, M. J.: *Biochem. Bioph. Res. Co.* **305**:761-770 (2003).
- [12] FARMER, E. E.; DAVOINE, C.: *Curr. Opin. Plant Biol.* **10**:380-386 (2007).
- [13] MENÉ-SAFFRANÉ, L.; DELLAPENNA, D.: *Plant Physiol. Bioch.* **48**:301-309 (2010).
- [14] MOON, J.-K.; SHIBAMOTO, T.: *J. Agric. Food Chem.* **57**:1655-1666 (2009).
- [15] MAGALHAES, L. M.; SEGUNDO, M. A.; REIS, S.; LIMA, J. L. F. C.: *Anal. Chim. Acta* **613**:1-19 (2008).
- [16] PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K.: *J. Agric. Food Chem.* **53**:4290-4302 (2005).
- [17] POTTERS, G.; De GARA, L.; ASARD, H.; HOREMANS, N.: *Plant Physiol. Bioch.* **40**:537-548 (2002).
- [18] KEGG Pathway Database. In *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*. [online]. [cit. 2013-06-29]. URL: <http://www.kegg.jp/kegg/pathway.html>.
- [19] GERSHENZON, J.; DUDAREVA, N.: *Nat. Chem. Biol.* **3**:408-414 (2007).
- [20] DUDAREVA, N.; KLEMPIEN, A.; MUHLEMANN, J. K.; KAPLAN, I.: *New Phytol.* **198**:16-32 (2013).
- [21] TOHGE, T.; WATANABE, M.; HOEFGEN, R.; FERNIE, A. R.: *Front. Plant Sci.* **4** (2013).
- [22] Kolektiv autorů: *WHO Monographs on Selected Medicinal Plants*. Ženeva: World Health Organisation Press, 1999 (vol. 1), 2004 (2), 2007 (3).
- [23] Kolektiv autorů: *Handbook of Herbs and Spices*. Boca Raton, Florida: CRC Press, 2001 (vol. 1), 2004 (2).
- [24] MORAVCOVÁ, J.: *Biologicky aktivní přírodní látky*. Studijní text. Praha: VŠCHT, 2006.
- [25] RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G.; : *Free Radical Bio. Med.* **20**:933-956 (1996).
- [26] de SOUZA, R. F. V.; De GIOVANI, W. F.: *Spectrochim. Acta A.* **61**:1985-1990 (2005).

- [27] DOWD, L. E.: *Anal. Chem.* **31**:1184-1187 (1959).
- [28] DENG, H.; Van BERKEL, G. J.: *J. Mass Spectrom.* **33**:1080-1087 (1998).
- [29] MOLYNEUX, P.: *Songklanakarin J. Sci. Technol.* **26**:211-219 (2004).
- [30] BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C.: *Lebensm. Wiss. Technol.* **28**:25-30 (1995).
- [31] RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C.: *Free Radical Bio. Med.* **26**:1231-1237 (1999).
- [32] MENG, Q.; QIAN, Z.; LI, X.; LI, D.; HUANG, W.; ZHAO, J.; LI, S.: *Acta Pharmaceutica Sinica B.* **2**:246-249 (2012).
- [33] HAYES, W. A.; MILLS, D. S.; NEVILLE, R. F.; KIDDIE, J.; COLLINS, L. M.; : *Anal. Bioch.* **416**:202-205 (2011).
- [34] Kolektiv autorů: *European Pharmacopoeia*. 5. vydání. Štrasburk: Rada Evropy, 2004.
- [35] BioLib.cz – Biological Library. [online]. [cit. 2013-04-08]. URL: <http://www.biolib.cz/cz/main/>.
- [36] CAI, Y.; LUO, Q.; SUN, M.; CORKE, H.: *Life Sci.* **74**:2157-2184 (2004).
- [37] DUDONNÉ, S.; VITRAC, X.; COUTIÉRE, P.; WOILLEZ, M.; MÉRILLON, J.-M.: *J. Agric. Food Chem.* **57**:1768-1774 (2009).
- [38] LIU, M.; LI, X. Q.; WEBER, C.; LEE, C. Y.; BROWN, J.; LIU, R. H.: *J. Agric. Food Chem.* **50**:2926-2930 (2002).
- [39] YAO, Y.; SANG, W.; ZHOU, M.; REN, G.: *J. Food Sci.* **75**:c9-c13 (2010).
- [40] WOJDYŁO, A.; OSZMIAŃSKY, J.; CZEMERYŚ, R.: *Food Chem.* **105**:940-949 (2007).
- [41] TSAO, R.; YANG, R.; XIE, S.; SOCKOVIE, E.; KHANIZADEH, S.: *J. Agric. Food Chem.* **53**:4989-4995 (2005).
- [42] ECKSCHLAGER, K.; HORSÁK, I.; KODEJŠ, Z.: *Vyhodnocování analytických výsledků a metod*. Praha: SNTL, 1980.
- [43] MILES, J.; BANYARD, P.: *Understanding and Using Statistics in Psychology: A Practical Introduction*. Londýn: SAGE Publications, 2007.
- [44] YILMAZ, Y.; TOLEDO, R.: *Food Chem.* **93**:273-278 (2005).
- [45] GARG, D.; SHAIKH, A.; MULEY, A.; MARAR, T.; : *Free Rad. Antiox.* **2**:41-46 (2012).
- [46] NUUTILA, A. M.; KAMMIOVIRTA, K.; OKSMAN-CALDENTEY, K.-M.: *Food Chem.* **76**:519-525 (2002).



Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovateli.

[illegible]